مقدمة في
علم الأحياء الجزيئي

الدكتور
خالد الكبيسي



www.darsafa.net

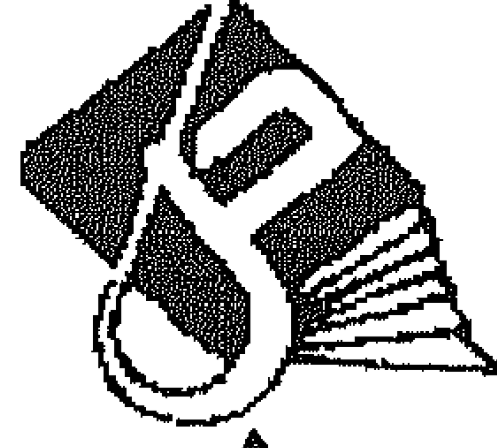
بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَىٰ عَالِمِ الْغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ ﴾

صدق الله العظيم

مقدمة في

علم الأحياء الجزيئي



دار صفاء للنشر والتوزيع

رقم التصنيف 574.1

مقدمة في علم الاحياء الجزيئي

د.خالد الكبيسي

الواصفات: العلوم النظرية // علم الاحياء

رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2015/9/1586)

ردمك ISBN 978-9957-402-46-4

عمان ـ شارع الملك حسين

مجمع الفحيص التجاري- تلفاكس ـ 4612190 6 962+

هاتف ـ 4611169 6 962+ ص . ب922762 عمان ـ 11192 الأردن

DAR SAFA Publishing - Distributing

Telefax: +962 6 4612190- Tel: + 962 6 4611169

P.O.Box: 922762 Amman 11192- Jordan

E-mail:safa@darsafa1.net

E-mail:safa@darsafa.info

www.darsafa.net

جميع حقوق الطبع محفوظة

All RIGHTS RESERVED

جميع الحقوق محفوظة للناشر. لا يسمح بإعادة إصدار الكتاب أو أي جزء منه أو تخزينه في نطاق استعادة المعلومات أو نقله بأي شكل من الأشكال دون إذن خطي من الناشر

All rights Reserved. No part of this book may be reproduced. Stored in a retrieval system. Or transmitted in any form or by any means without prior written permission of the publisher.

مقدمة في

علم الأحياء الجزيئي

الدكتور

خالد الكبيسي

الطبعة الثانية

2016م - 1437هـ



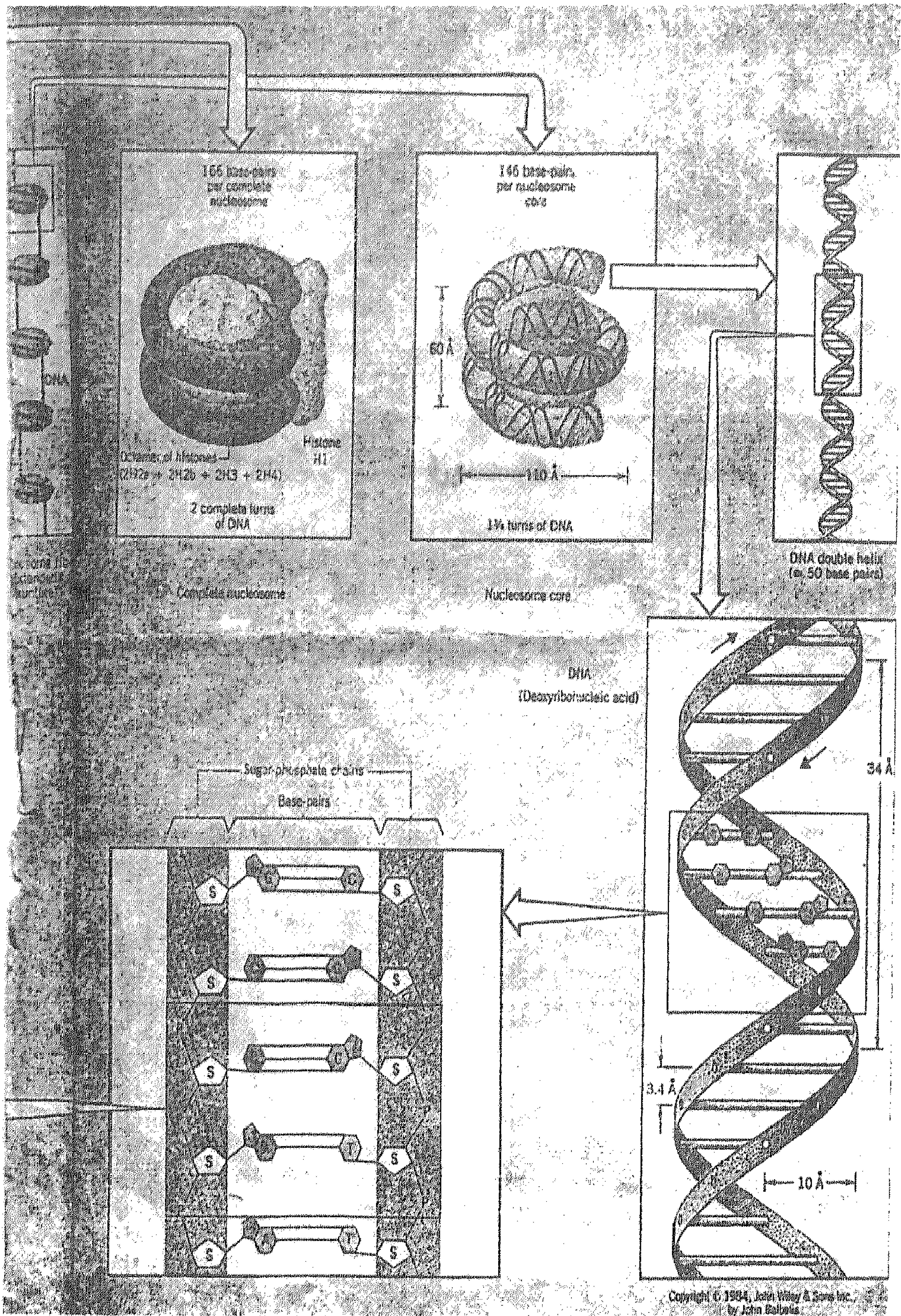
دار صفاء للنشر والتوزيع - عمان

الإهــــداء

إلى والديّ رحمهما الله

وزوجتــي العــزيزة

وأحبائي فادية ومحمد



Copyright © 1984, John Wiley & Sons Inc., by John Balbalis

المقدمة

يعتبر علم الأحياء الجزيئي من العلوم الحديثة جدا والتي توسع وتطور في السنوات الأخيرة وشملت حقول عملية وتطبيقية كثيرة وخاصة استخداماته في مجال الطب والصناعة والزراعة والصيدلة وغيرها.

وسعيا مني الى اغناء المكتبة العربية العلمية برافد علمي جديد ينهل منه الطالب بيسر وسهولة والمهتمين بهذا الحقل من العلوم قمت بتأليف هذا الكتاب المتواضع الذي أود ان ابين انه لا يعني ان هذا الكتاب في درجة عالية من الكمال ولكن اعتقد الاستفادة منه للدراسين والمهتمين على حد سواء لقد ساهمت التطورات في العلوم الكيميائية والفيزيائية مساهمة كبيرة فيما يتعلق بعلم الأحياء الجزيئي نتيجة تقدم الطرق والأساليب المستخدمة في دراسته.

وكما ساهمت الدراسات والابحاث في مجال الكيمياء الحيوية ووراثة البكتيريا والخلية على المستوى الجزيئي في تطور هذا العلم وتوسعه.

الا ان هناك الكثير الذي لا يزال يحتاج الى المزيد من البحث والتمحيص ولقد حاولت جهد الامكان عند كتابة هذا الكتاب الاحاطة بأخر الدراسات في مجال علم الأحياء الجزيئي والاتجاهات الحديثة لتطبيقه .

توخيت عند شروعي في تأليفه بأن يكون شاملا لكثير من الجوانب المتعلقة به في ضوء الخبرة في تدريس هذا المقرر في كليات العلوم المختلفة. وهو يشتمل على احد عشر باباً ينتهي بالتطبيقات العملية في مجال الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية . .

واني لا ازعم انني قد بلغت الغاية وانما هـي خطوة على الطريق وبهذا اقدم اعتذاري لزملائي وجمـيع المهتمين في الجامـعات العربية عن الأخطاءالـبسيطة التي قد يـجدونها في هذا الكتاب وأملي ان يسهم في دعم المكتبة العـلمية العربية وان اكون قد وفقت في عـملي هذا والله ولي التوفيق.

د. خالد الكبيسي

المحتويات

الباب الثالث

الفصل الأول

تطور علم الأحياء الجزيئي

تطور علم الأحياء الجزيئي

عند دراستنا لأي علم من العلوم يلزمنا معرفة بسيطة عن التطور الذي حدث لهذا العلم تاريخيا وعن الاشخاص الذين اسهموا في هذا التطور والى تطور التقنيات التي ساهمت في تفسير الكثير من الظواهر والآليات الجزيئية لفك الكثير من الالغاز الحياتية.

نشأ علم الوراثه عام ١٨٦٥ من قبل مندل وبعد اكتشاف تجاربه عام ١٩٠٠ تم الحصول على كثير من الحقائق من التجارب الاخرى على مختلف الكائنات الحية.

وفي عام ١٩٠٢ استخدمت كلمة المورثات (Genes) من قبل العالم جوهانسن.

وافترض فلهم روكس ١٨٨٣ ان الكروموسومات في نواة الخليه حامله للعوامل الوراثية وفي عام ١٩٠٢ أثبت بوفري وساتون أن المورثات هي اجزاء من الكروموسوم.

وقد تطورت نظرية الجين كوحدة من الكروموسوم بواسطة العالم موركان **Morgan** ومساعديه بدراستهم على ذبابة الفاكهة. وقد عمل مولر **Muller** على ضم علم الخلية مع علم الوراثه التي ساهمت في وضع نظرية الكروموسوم وسمي بالوراثه الخلوية وفي عام ١٩٣٠ استطاع العالم بيدل **Beadle** وآخرون على وضع اساس لفهم الخصائص الوظيفية للجينات وهي امتداد لمفهوم الجين التقليدي. والجينات (المورثات) وحدات لا تجزء تركيبه للطفرة ووحدات الوظائف.

وقد عمل العديد من العلماء للكشف عن المفهوم الوظيفي للجينات في خلايا بدائية النواة (البكتيريا) وحقيقة النواة.

وتمكن ايفري **Avery** (١٩٤٤) ومساعديه من تشخيص الجزيئات الكبيرة الحاملة للمعلومات الوراثيه في البكتيريا وكذلك العالمان هيرشي وشاس **Hershey and Chase** (١٩٥٢) في الفايروس اللذين برهنا على ان المادة الوراثيه هي **DNA** وليس البروتين

واستطاع ايفري من اثبات ان المادة التي تغير الصفات في البكتيريا هي الـ DNA .

ونتيجة للبحوث التي اجراها عدد من العلماء على الحامض النووي الدنا DNA مثل جاركاف chargaff (١٩٥٠) والصور المأخوذة بانكسار الاشعة السينية تمكن االعالمان واطسن وكريك watson and crick (١٩٥٣) من وضع التركيب الحلزوني المزدوج للدنا الذي يساهم في فهم الكثير من الحقائق التي يعتمد عليها علم الأحياء الجزيئي.

وقد اكتشف العالم كورنبرك korenberg (١٩٥٧) الانزيم المخلق للدنا والذي يعرف ايضا باسمه وتمكن من تخليق الدنا خارج جسم الكائن الحي (الدراسات الزجاجية) in vitro .

وفي التجربة الرائدة التي اجراها العالمان ميسلسون وستال Meselson and stahl عام ١٩٥٨ على البكتيريا المعوية اثبتا فيها ان الحامض النووي الدنا يتضاعف بطريقة الاحتفاظ النصفي ومن ناحية اخرى اثبت العالم Taylor وآخرون بان التضاعف النصف محافظ للدنا يتم في خلايا حقيقية النواة ١٩٦٠.

ووضع كلا من جاكوب ومونود Jacob and Monod ١٩٦١ نموذج الاوبرون لتنظيم التعبير الجيني (تنظيم تخليق البروتين) شهدت السبعينات من هذا القرن كثير من الاكتشافات وخاصة فيما يخص الانزيمات القاطعة والانزيم الناسخ العاكس التي ادت الى نمو واتساع المعلومات في علم الأحياء الجزيئي والذي قادت الى عملية اعادة تشكيل الدنا Recomobination DNA واكتشاف تسلسل النكليوتيدات في شريط الحامض النووي الدنا.

يعتمد علم الأحياء الجزيئي على علم حياة الخلية ووراثة البكتيريا والكيمياء الحيوية وقد ساهمت كثير من التقنيات الحديثه في مجالات مختلفه الى تطور هذا العلم مثل التصوير الشعاعي الذاتي ، والطرد المركزي متدرج الكثافه والمجهر الالكتروني والهجره الكهربائية وغيرها.

ويهتم هذا العلم في الكيفيه التي يتم فيها تضاعف الجينات والمحافظة على النظام الوراثي الثابت وكيفية تطفير الجين كما انه يهتم في التغيرات الجزيئية للاحماض النووية والتعبير الجيني والكيفية التي تتم فيها اعادة اتحاد وتشكيل الاحماض النووية وتبادل الاجزاء بين مثلا الفايروس والمضيف والكيفية التي بستطيع فيها الحامض النووي ادماج نفسه مع الحامض النووي للمضيف.

لقد قادت كثير من الدراسات الى اتساع مجال علم الأحياء الجزيئي مثل الدراسة المتعلقة بتغير طبيعة الدنا (الدنترة) عند ارتفاع درجة الحراره واعادة اتصال الشريطين مع بعضهما عند التبريد البطيء التي قادت الى عملية التهجين كما تم تعين مواقع الجينات والتعبير الجيني وتنظيمه، وفك رموز عملية تنظيم وتضاعف الدنا.

ان جميع الاكتشافات المذكورة اعلاه قادت الى مفهوم الهندسة الوراثيه (التلاعب بالجينات والسيطرة عليها) وشهد العقدين الاخيرين تقدما واسعا في تقنيات الهندسة الوراثيه والتي بواسطتها تم فهم العديد من الامراض الوراثية لغرض اصلاحها وفي مجال الانتاج فقدتم فهم الكيفية التي يتم فيها انتاج هورمون الانسولين (الخاصة بمرض السكر) والانترفيرون (مادة مناعية للسيطرة على مرض السرطان) بالاضافة الى الاتجاهات الحديثه للمناعة للحصول على الكثير من اللقاحات واندساس بعض الجينات المسؤولة عن تكوين الاجسام المضاده في خلايا حقيقية النواة اللمفاوية.

كما يجري الأن دس كثير من الجينات في خلايا الامشاج كجين هورمون النمو للحصول على حيوانات كبيرة الحجم كالعجول والدواجن وغير ذلك أو تبديل الجينات غير الطبيعية بجينات طبيعية في نخاع العظم لاصلاح بعض الامراض الوراثيه مثل فقر الدم المنجلي وتكسر كريات الحمر الثلاسيميا . . .

الفصل الثاني

التركيب العام للخلية

التركيب العام للخلية
General structure of the Cell

تقسيم الكائنات الحية من وجهة نظر علم الخلية الى قسمين هما :

١- كائنات بدائية النواة **Procaryotic**

٢-كائنات حقيقية النواة **Eucaryotic**

تمثل الفايروسات والمايكوبلازما والبكتيريا والطحالب الخضراء-المزرقة المجموعة الأولى والتي تتميز بعدم وجود نواة حقيقية لعدم وجود الغلاف النووي وقد استخدمت البكتيريا بشكل خاص في الدراسات الجزيئية وخاصة البكتيريا المعوية **Escherichia coli** .

فالفايروسات (الرشحيات) تمثل شكلا من اشكال الحياة وان كان لا تعتبر خلايا **viruses are not cells** وهي اقل تعقيدامن النظام الخلوي لبدائية النواة وحقيقية النواة.

تشترك جميع الفايروسات بخواص اساسية حيث انها جميعا طفيليات اجبارية داخل الخلايا اذ أنها تتطفل على النبات والحيوان والبكتيريا. وتوجد الفايروسات على حالتين مختلفتين أما داخل خلايا المضيف **Host** أو خارج الخلاياوالحالة الأخيرة توجد بشكل جزيئة تسمى **virion** .

وبشكل عام فالرشحيات صغيرة الحجم (مثل حجم الرايبوسومات) ويبلغ حجمها من ٢٠-٢٠٠ نانومتر وهي تصيب أصغر خلية.

ليس للرشحيات اي من العضيات الخلوية وبهذا فانها لا تقوم بعمليات ايضية (ميتابولزم) ويعتمد تضاعفها على قدرتها للدخول في خلايا الكائنات الحية من البكتيريا وحتى الانسان.

يتألف الفايروس من جزء مركزي للاحماض النووية **DAN** او **RNA** يحاط بغلاف يتكون من جزئيات بروتنية كما تدخل مركبات اخرى مثل الليبيدات أو السكريات المعقدة في تركيب غلاف الرشحيات المعقدة. والفايرس الحقيقي يحاط بغلاف مكون من **lipoprotein** ويقوم الغلاف بحماية الفايرس عندما يكون في طور خارج الخلايا اثناء دورة الحياة وفي حماية الحامض النووي من الهضم بالانزيمات داخل الخلايا.

وتقسم الفايروسات اما حسب خلايا المضيف الى فايروسات حيوانية إو نباتية إو بكترية إو انها تقسم حسب نوع المادة الوراثيه التي يحملها الى **DAN** -فايرس او **RNA** -فايروس.

وتمتاز الفايروسات بسهولة دراستها على المستوى الجزيئي وذلك لان المادة الوراثية التي تحتويها لها عدد محدود من الجينات.

ومن الجدير بالذكر فان الفايروسات لا تحتوي على الرايبوسومات وهي المواقع التي يتم عليها صناعة البروتين الا انه وجد أن بعض الرشحيات الانحيازية (الارتكاسية) **Retroviruses** التي منها فايرس مرض الايدز **Aids** والتي تنحاز الى الخلايا اللمفاوية للانسان تحتوي على بعض الانزيمات مثل **Reverse transcriptase** الانزيم الناسخ العاكس .

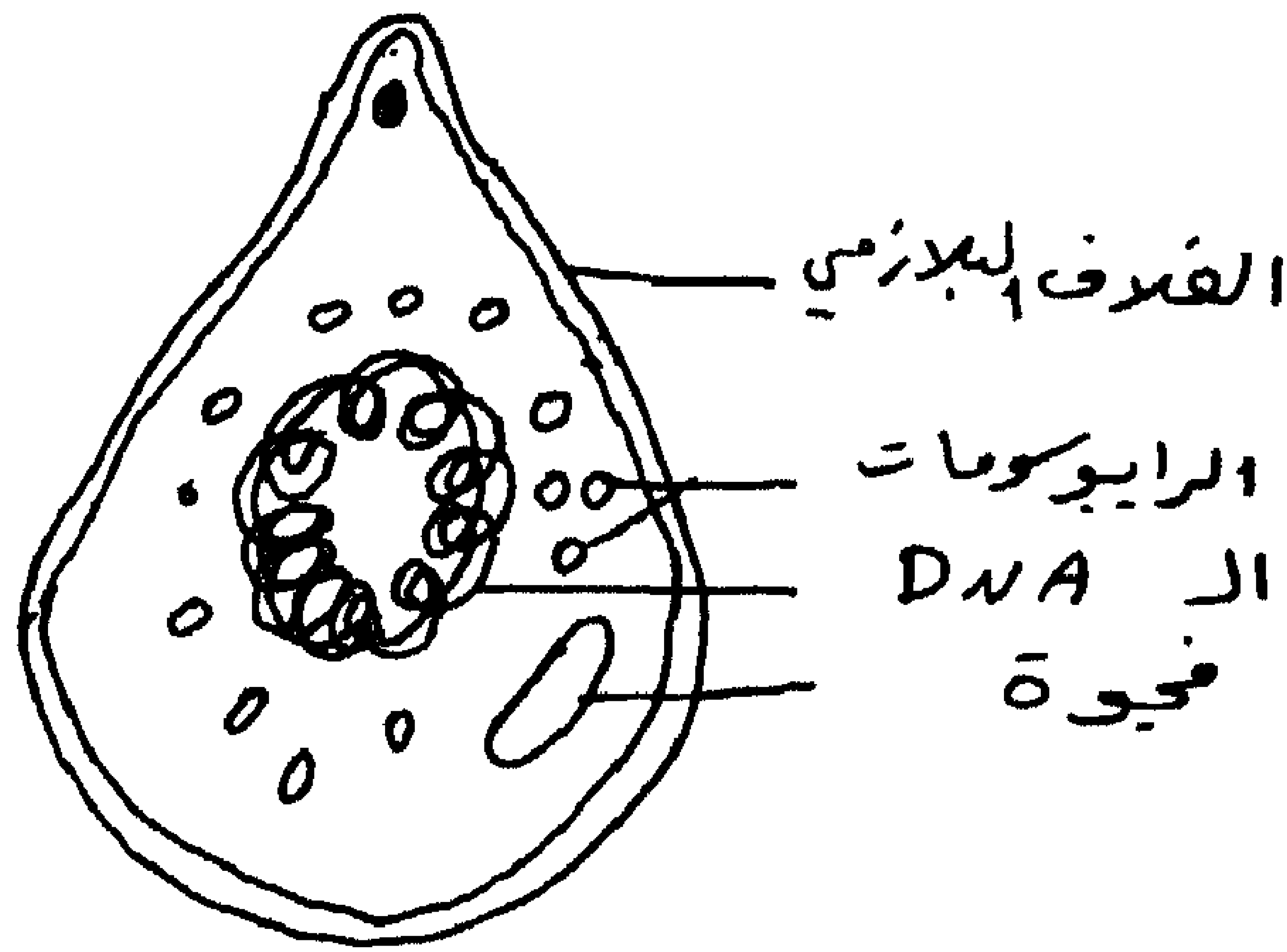
المايكوبلازما Mycoplasma

وتسمى **(pplo)** وذلك لانها تسبب امراض للحيوان والنبات والحشرات حيث انها تتطفل على هذه الكائنات الحية . وهي وكائنات حية خلوية صغيرة تقع بين الرشحيات والبكتيريا ويتراوح حجمها من (٠,١ الى ٠,٣ ميكرون).

يحاط جسمها بغلاف بلازمي يتكون من مواد بروتنية حوالي ٧٠٪ ومواد ليبيدية

(دهون) ٣٠٪ ولا تحاط بجدار خلوي **cell wall** كما هو الحال في البكتيريا وبداخل الغلاف تقع منطقة المادة الوراثية التي تتكون من الـ **DNA** الحلقي المكون من سلسلتين مزدوجة كما تنتشر الرايبوسومات في السايتوبلازم.

يتم تضاعفها بالانقسام البسيط أو بتكوين براعم في بعض الانواع. كما أنها تنمو وتعيش في مزارع صناعية ولا تحتاج الى خلايا المضيف لغرض التضاعف ولكنها تنمو وتتكاثر في خلايا المضيف مسببة تاثيرات مرضية.



شكل (٢-١) شكل تخطيطي لخلية المايكوبلازما

البكتيريا Bacteria

تتميز الخلايا البكتيرية عن خلايا حقيقية النواة من الأحياء الدقيقة في المحتوى وعدد من العضيات الخلوية المشابهة.

فحجم خلية البكتيريا يماثل حجم الميتوكوندريا في حقيقية النواة (الحيوانية والنباتية) ونظرا لصغر حجم الخلية فان عضياتها تكون صغيرة جدا فهي تحتوي على رايبوسومات وعلى منطقة النواة **nucleoid** .

تحاط الخلية الـبكتيرية بجدار خلـوي وهو يختلف عن الجدار الخلـوي في الخلية النباتية حيث انه يتكون من البروتينـات والسكريات والليبيدات وعلى اساس التركيب الكيـماوي للجدار تقـسم البكتيـريا الى قسمين وهـي الموجبة لصبـغة كرام **Gram posative** حيث يتكون من سكريات مضاعفة مع بروتينات بحيث يتكون من مادة **Murien** مثل **Bacillus subtilis** وهي اكثر حساسية لمركبات البنسلين.

أما النوع الثاني من البكتيريا فهي السالبة لصبغة كرام **Gram-negative** فجدارهـا مشابهـه للبكتـيريا الموجبـة بالاضافة الـى وجود طبقة خـارجية اضافـية من الليبيدات وهي طبقـة سامة للكائنات الاخرى كما هي الحـال في بكتـــيريا القـولون **E. coli** وهي أقل حساسية لمركبات البنسلين.

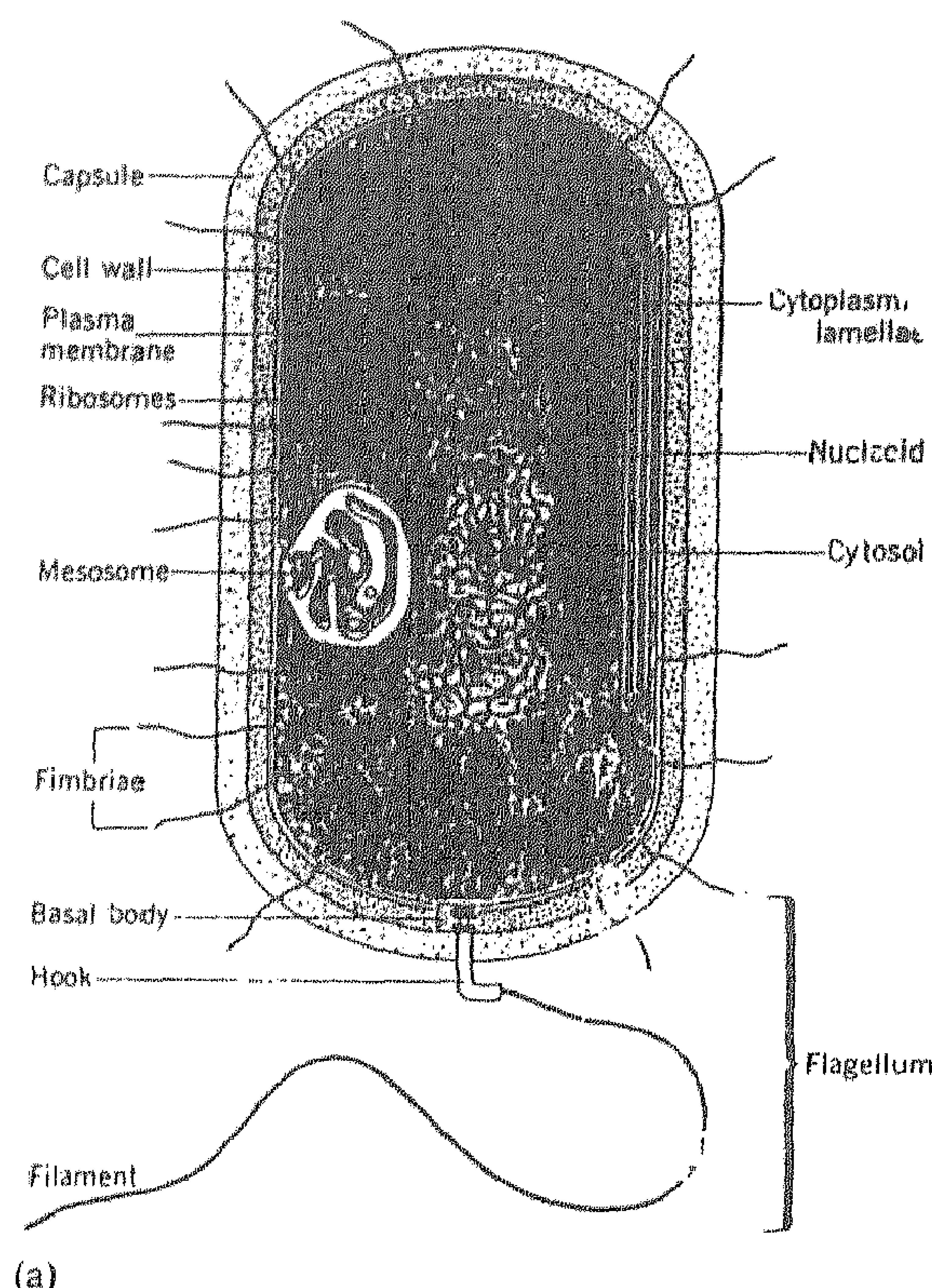
إلى الداخل من الجدار يوجد الغلاف البلازمي **cell membrane** والذي يتكون من البروتين والليبيدات ويمكـن هضم الجدار الخلوي بواسطة انزيم اللايسوزيم **lysozyme** بحيث ينعزل البروتوبلاست ويصبح حرا.

كما توجد مادة الـ **DNA** كجزيئي طويل ورفيع وحلقي ويشغل حوالي ٢٠٪ من التركيب الداخلي للخلية.

ويحاط بتـراكيب بروتوبلازمـية وهي الرايبوسـومات التي يبلـغ عددها ٢٠-٣٠ ألف وحدة وتتألـف من ٤٠٪ بروتين و٦٠٪ من ال **RNA** وهي أصغر حجما من رايبوسومات الخلايا حقيقية النواة ومعامل ترسيبها ٧٠S بدلا من ٨٠S.

تتكـون طيات الى الـداخل من الغلاف الـبلازمي مكـونة تراكيب يـطلق علـيها بالجسيمات الوسطية **Mesosomes** تلعب دورا في انقسام الخلـية كما أنها مواقع لانزيمات المولدة للطاقـة (كما هي الحال في الميتوكوندريا لحقيقيـة النواة) كما تشكل هذه التراكيب في بعض انـواع البكتيريا القادرة على البناء الضوئـي عضيات التركيب الضوئي الحاملة للصبغات.

أما النواة البـكترية فهي لا تنفصل عـن السايتوبلازم بغلاف (بدائـية) كما هي الحال في حقيقية النـواة، وتحتل محتويات النواة منطقة خاصة من جـسـم الخلية يطلق عليه شبـيه النواة **'nucleoid** ويشكل **DNA** حوالي ١٪ مـن كتلة الخـلية ولا يـرافـق ال **DNA** البروتـينات المسمـاة بالهسـتونات **Histones** والموجـودة في كروموسومات حقيقية النواة. كما لا توجد النوية.



شكل (٢-٢) يبين تركيب خلية البكتيريا

اما **RNA** فيشكل حوالي ٦٪ من كتلة الخلية البكتيرية بالاضافة إلي الماء الذي يشكل ٧٠٪ والاملاح ومكونات عضوية اخرى.

السوط البكتيري: Bacterial flagellum

تمتلك العديد من البكتيريا على سوط واحد أو اكثر والذي يستخدم لحركة الخلية وينشأ السوط من جيبة قاعدية صغيرة. والسوط البكتيري اصغر حجما منه في خلايا الحيوان النبات كما انه ابسط تركيبا حيث انه يتألف من خيط مفرد من البروتين المسمى بالفلاجلين **flagellin** .

الاهداب Pili

وهي على عدة انواع واطوالها مختلفة تتكون من خيوط رفيعة جدا طولها يتراوح من ٠,٥ - ٢٠ ميكرون ولا ترى الا بالمجهر الالكتروني وتعمل كملزنات (تكتل) **agglutinate** للخلايا (الدم الحمر وخلايا النبات والخمائر والخلايا الحيوانية) .

تعمل الـ **pili** كقنوات في البكتيريا المقترنة لتبادل المادة الكروموسومية وتتألف من وحدات بروتنية خيطية تسمى بالبلين **pillin** وزنها الجزيئي حوالي ١٧٠٠٠ .

بعض خيوط الـ **pili** تعمل كمستقبلات للعاثيات **phages** وبعضها مرافقة للبكتيريا المسببة للامراض.

٢- الكائنات حقيقية النواة Eukaryotic :

وتكون فيها محتويات النواة مفصولة بواسطة غلاف عن بقية أجزاء الخلية وتمثل الخلايا الحيوانية ومنها الابتدائيات **protozoa** والخلايا النباتية والخمائر والطحالب والفطريات وتمتاز هذه المجموعة عن المجموعة الاولى بكبر حجومها وتعقيد تركيبها الداخلي. الا انها تختلف فيما بينها من حيث الحجم والشكل والتركيب والوظيفة ويمكن ملاحظة الشكل رقم (٢ - ٣) الذي يبن بعض انواع الخلايا الحيوانية والنباتية.

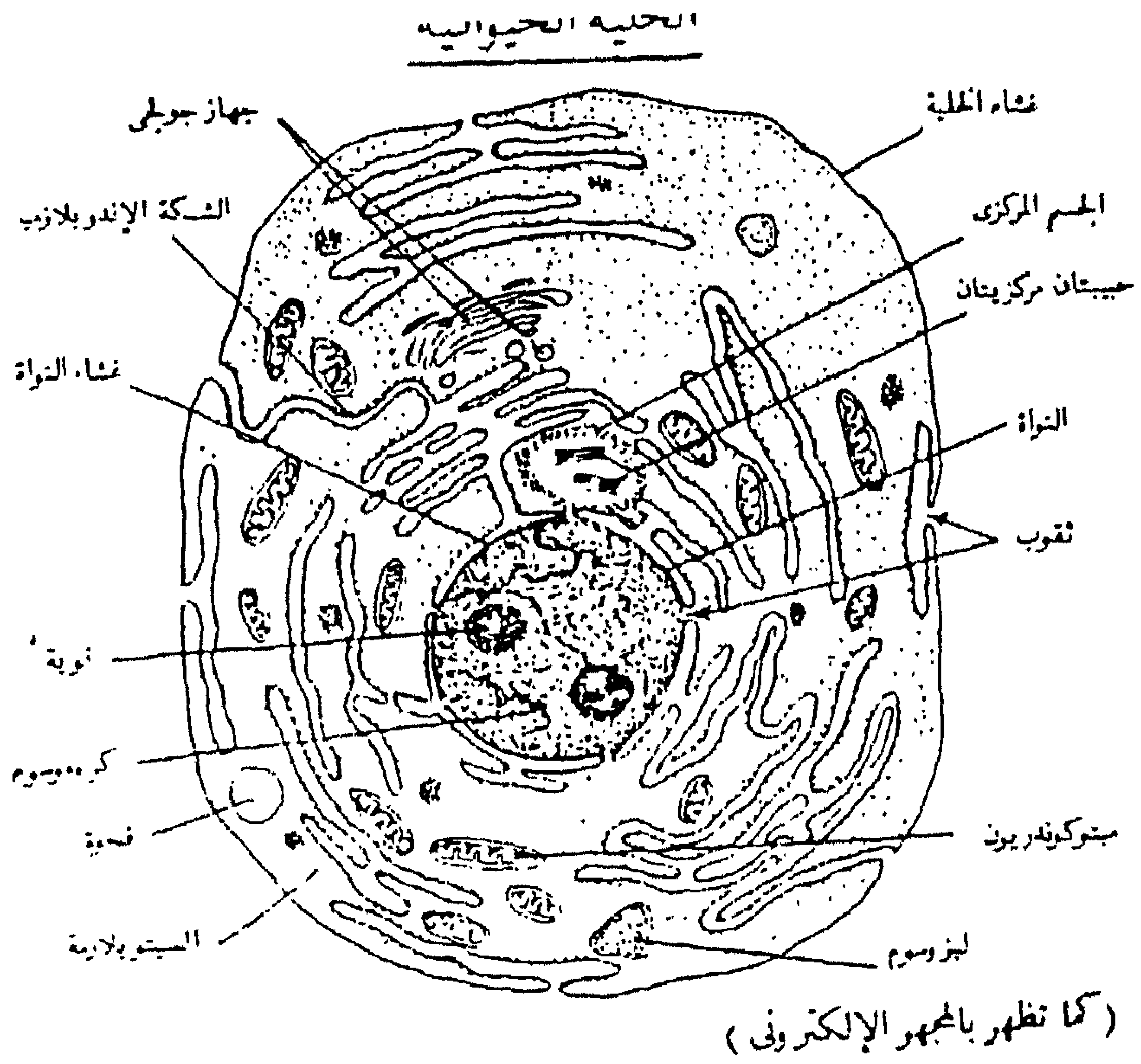
محتويات الخلية

يتميز البروتوبلازم للخلية إلى قسمين اساسيين هما للبلازما النووية nucleoplasm والقسم الثاني يحيط بالنواة يسمى بالسايتوبلازم cytoplasm.

تفصل النواة عن السايتوبلازم بواسطة غلاف يسمى بالغلاف النووي nuclear membrane وتحاط الخلية بأكملها بواسطة غلاف الخلية cell membrane أو ما يسمى بالبلازما لما Plasma-lemma وتعمل هذه الاغلفة على حماية المحتويات الداخلية وتنظيم تبادل المواد بين النواة والسايتوبلازم من جهة وبين الخلية والوسط الخارجي من جهة ثانية.

يحتوي السايتوبلازم على تراكيب حية عديدة تسمى بالعضيات السايتوبلازمية cytoplasmic organelles.

كما يحتوي على مواد اخرى غير حية مثل النشا والنشا الحيواني وقطرات زيتية واصباغ ومواد افرازية وافراغية وغيرها.



(كما تظهر بالمجهر الإلكترونى)

شكل (٢-٣) يبين تركيب الخلية الحيوانية

الغلاف الخلوي : Cell Membrane

اوضحت العديد من الدراسات إلى ان الغلاف الخلوي وفي انواع مختلفة من الخلايا انه يتركب من الليبيدات والبروتينات ويبدو بالمجهر الالكتروني بعد استخدام رابع اوكسيد الاوزميوم بانه تركيب ثلاثي الطبقات طبقة مركزية فاتحة اللون محاطة بطبقتين غامقتي اللون. فالطبقات الغامقة تمثل البروتينات أما الطبقة المركزية الفاتحة فتمثل الليبيدات وقد تأكد من وجود ثقوب دقيقة في الغشاء وثبت ايضا ان بعض الثقوب تحمل شحنات كهربائية موجبة أو سالبة وتعمل هذه الثقوب على التنظيم والسيطرة لمرور الأيونات.

وقد ضع العالمان سنجر ونيكلسون عام١٩٧٢ **Singer and Nicolson** والذي يلقي قبولا كبيراً نمودجا لتركيب الغشاء وهو النمودج الموزائيكي السائل **fluid-mosaic model** وخلاصة النمودج هو ان الغلاف الخلوي يتكون من طبقة دهنية ثنائية الجزئيات تحاط من السطح بطبقة بروتنية قسما من البروتين متصل مع الجزء القطبي للدهون وسمي بالبروتين المحيطي والقسم الأخر يدخل بين جزيئات الدهون الى الداخل ويسمى بالبروتين المكمل وتتصل مع البروتين سلاسل من السكريات تسمى **glyco protein** وتلعب هذه السكريات دورا هاما في بعض الظواهر الفسيولوجية كالتصاق الخلايا ببعضها.

أما لبيدات الغشاء فاغلبها من نوع الليبيدات الفوسفاتية والكوليسترولية كما تستخدم مع الليبيدات مواد سكرية مكونة السكريات الليبيدية **glycolipids**.

لقد دعم هذا النموذج عن طريق تقنية تسمى بالتكسير التجمدي: **freeze fructure analysis** والخدش التجمدي **freeze-etching**

ويبين النموذج الموزائيكي السائل ان الغلاف في حالة ديناميكية حيث ان

للبروتينات والمواد الدهنية القدرة العالية على الحركة تحت ظروف فسيولوجية اذ يقوم بتنظيم حركة الذائبات والمذيبات من الخلية واليها ويكون اختياري النفاذية **selectively permeable** حيث يسمح بمرور مواد ويمنع مرور اخرى ، وتعتمد النفاذية على عوامل عدة مثل الحالة الفيسولوجية للخلية ودرجة تركيز الاملاح في الوسط المحيط بالخلية ودرجات الحرارة.

العضيات السايتوبلازمية:cytoplasmic organelles

الشبكة الاندوبلازمية:Endoplasmic Reticulm

لاحظ بورتر **Borter** عام ١٩٤٥ ان ارضية السايتوبلازم تحتوي على جهاز من التجاويف الدقيقة المتفرعة المحاطة باغشية اطلق عليها الشبكة الاندوبلازمية (يرمز لها **E R**).

وتأكد من وجود هذه الشبكة في ما بعد بواسطة المجهر الالكتروني ويفترض ان هذه الشبكة تقسم السايتوبلازم إلى قسمين قسم داخلي وقسم خارجي محيطي يسمى بالسايتوسول **Cytosol** وغلاف الشبكة له مساحة سطحية تبلغ عشرة أضعاف المساحة السطحية للغلاف البلازمي.

تتصل بالغشاء البلازمي من الخارج وبالغشاء النووي من الداخل.

وتقسم الشبكة الاندوبلازمية إلى نوعين هما :

١- الشبكة الاندوبلازمية الخشنة : **Rough E R**

يتميز هذا النوع بوجد عدد كبير من الجينات الدقيقة على السطح الخارجي للشبكة تسمى بالرايبوسومات وتكثر في الخلاياالتي تنتج البروتين مثل الانزيمات والغدد الفارزة مثل الكبد والبنكرياس وتكون نامية بشكل جيد.

٢- الشبكة الاندوبلازمية الملساء : **Smooth E R**

يمتاز هذا النوع بخلوه من الرايبوسومات وتحتوي اغشيتها على انزيمات ضرورية في تخليق مركبات ليبيدية مثل الستيرولات وفوسفاتيدات ومن المحتمل انها تلعب دوراً في ايض الليبيدات. ويكثر جودها في خلايا الكبد وخلاياالانسجة الدهنية.

يعتقد ان الشبكة الاندوبلازمية تقوم بوظائف اخرى مثل النقل بين الاجزاء السايتوبلازمية المختلفة. كما انها تقوم في العضلات بالتهيج العضلي من السطح إلى داخل الخلية في الليفات العضلية حيث يفرز ايون الكالسيوم الهام في العملية.

وتتكون اغشية الشبكه الاندبلازمية من مواد دهنية وبروتنية متحدة مع بعضها البعض فيما يسمى بالليبوبروتين.

كذلك وجد باستخدام تقنية التصوير الشعاعي الذاتي **Autoradiography** ان الانزيمات اللازمة لتخليق الكلايكوجين توجد في أغشية الشبكة الاندوبلازمية الملساء كما وجد أنها تحتوي على انزيمات تعمل على ازالة السميه **Detoxification** لبعض العقاقير والمواد المسرطنه والمطفرة.

الرايبوسومات The Ribosomes

وهي عبارة عن جسيمات صغيرة تقع على السطح الخارجي للشبكة الاندوبلازمية أو توجد حرة في السايتوبلازم وتتكون كيميائيا من البروتين والحامض النووي الرايبوزي **RNA** .

الوظيفة الاساسية للرايبوسومات هي تخليق البروتين وسنتكلم عن هذه العملية تفصيليا في الفصل الثامن.

اجسام كولجي The Golgi complex

وهي تشبه تركيب الشبكة الاندوبلازمية وهي عبارة عن مجموعة من الاكياس

المسطحة تعرف بالصهاريج وخالية من الرايبوسومات وقد اكتشف هذا التركيب عام ١٨٩٨م من قبل العالم كامىلليو كولجي له القابلية على ترسيب نترات الفضة ورابع اوكسيد الازومبوم يتراوح عدد الصهاريج المكونة لجهاز كولجي في معظم الخلايا الحيوانية والنباتية بين (٣-٧).

يعتمد عدد أجهزة كولجي في الخلية على نوع الخلية ونشاطها الايضي.

ويتكون جهاز كولجي كميائيا من مواد دهنية وبروتنية متحدة مع بعضها في مادة ليبوبروتينية معقدة التركيب. يكثر وجوده في الخلايا الفارزة حيث انها تلعب دوراً هاماً في عمليات الافراز الخلوي مثل المواد الخام والتي تتكون منها الانزيمات والتي تعرف بالزايموجين **zymogen** وافرازالصفراء والمواد المخاطية من الخلايا الكأسية الموجودة في النسيج الطلائي للامعاء كما يعتقد ان له دور في تكوين الجسم القمي للحيوانات المنوية والسائل الزجاجي في المفاصل.

أما في الخلايا النباتية فيقوم بافراز المواد البكتينية وانصاف السللسيلوز المكونات الرئيسية للصفيحة الخلوية لجدار الخلايا النباتية المنقسمة .

الاجسام الحالة The Lysosomes

تحتوي العديد من الخلايا الحيوانية وكذلك النباتية على تراكيب حويصلية أو كروية الشكل أصغر من الميتوكوندريا محاطة بغشاء مفرد وتحتوي على انزيمات محللة مختلفة لها القدرة على هضم البروتينات والاحماض النووية والكاربوهيدرات والليبيدات وعند تحطم الغلاف تنطلق الانزيمات وتهضم الخلية ويعتقد انها المسؤولة عد الهضم داخل الخلايا للجزيئات التي تدخل بطريقة الادخال الخلوي **Endocytosis** كما تلعب دورا مهما في تحطيم الخلايا الميته لكي تستبدل باخرى جديدة وعند الاستحالة في اختفاء الذيل في الضفدع.

أما أصل هذه الجسيمات فاما يكون من الشبكة الاندوبلازمية أو جهاز كولجي أو كليهما.

الاجسام الدقيقة Microbodies

وهي عبارة عن تراكيب بيضوية الشكل محاطة بغشاء ليبوبروتيني مفرد. توجد في انواع مختلفة من الخلاياالحيوانية والنباتية .

وتوجد على نوعين هما:

١- الكلايوكسيسومات **Glyoxysomes** توجد فقط في الخلايا النباتية تحتوي على انزيمات تقوم بتحويل المواد الدهنية إلى كاربوهيدرات حيث يتكون نتيجة ذلك بيروكسيد الهيدروجين وهي مادة سامة لذلك يقوم انزيم الكاتليز **catalyase** الحاوية عليه بتحلله إلى الماء والاوكسجين.

٢- البيروكسيسومات **peroxisomes** توجد في الخلايا الحيوانية والنباتية تتميز باحتواءها على عدد من الانزيمات مثل **-D,L-aminoacid** **oxidase-catalase** والـ **peroxidase** والـ **urate-** والـ **oxidas**

تلعب هذه الجسيمات دورا مهما في عملية تحلل بيروكسيد الهيدروجين السام في الخلايا الحيوانية والنباتية إلى الماء والاوكسجين.

وفي الخلايا النباتية تؤدي دورا هاما في عملية التنفس الضوئي **photorespiration** الحاصل اثناء عملية البناء الضوئي.

الفجوات The vacuoles

تحتوي الخلايا الحيوانية وخاصة النباتية منها على فجوات ممتلئة بمادة سائلة وتوجد انواع مختلفة من الفجوات في الحيوانات الابتدائية **protozoa** مثل

الفجوات الانقباضية **contractile vacuoles** التي تلعب دورا هاما في عملية تنظيم الضغط الاسموزي. كما توجد فجوات غذائية **food vacuoles** تحتوي بداخلها على دقائق غذائية وكائنات حية صغيرة.

كذلك تحتوي الخلايا النباتية الفتية على عدد من الفجوات التي تتسع تدريجيا وتتحد مع بعضها اثناء نمو الخلية حيث تكون في النهاية فجوة كبيرة مركزية في الخلية البالغة وتحتوي على مواد أيضية مختلفة بالاضافة الى الماء والاملاح وبعض الاصباغ.

الميتوكوندريا : The Mitochonderia

وهي تراكيب سايتوبلازمية حبيبية أو خيطية الشكل ويتغير شكلها اعتماداعلى الحالة الفسيولوجية للخلية أو معاملتها ببعض المواد اما حجمها فيبلغ (٠,٥ -١ ميكرون) في القطر وإلى ٧ ميكرون طولاً .

وتوجد في جميع الخلايا حقيقية النواة التي تتنفس هوائياً.

ويختلف عددها حسب نوع الخلية ففي الخلايا الكبدية توجد أكثر من ١٦٠٠ وفي انواع من الاميبا توجد حوالي نصف مليون، أما في الخلايا النباتية فان عددها اقل مما في الخلايا الحيوانية، وفي الطحالب مثل الكلاميدوموناس والميكروموناس تحتوي الخلية على ميتوكوندريا واحدة فقط كبيرة.

وبما ان الميتوكوندريا المجهز الرئسي للطاقة يطلق عليها احيانا بيت الطاقة **power house** فان توزيعها في الخلية يعتمد على النشاط الايضي الحاصل في الخلية. ففي الخلايا العضلية تترتب بشكل صفوف بين وحدات التقلص العضلي. وتتجمع بشكل حلقة في ذيل السبرم. وفي بعض الخلايا يلاحظ انها ثابته وفي الخلايا المنقسمة تبدو متحركة.

تحاط الميتوكوندريا بواسطة غلافين الخارجي املس اما الداخلي فيكون ذو طيات للداخل تسمى بالاعراف Cristae ويختلف عدد وشكل الاعراف باختلاف الخلايا والكائنات الحية.

اما المكونات الكيمائية فقد وجد انها تحتوي على حوالي ٧٠٪ بروتين و٢٥٪ ليبيدات و٠,٥٪ RNA وكمية صغيرة من ال DNA .

وتعتبر الميتوكوندريا المستودع الرئيسي للانزيمات التنفسية في الخلية وفيها يتم انتاج مركب الطاقة الادينوسين ثلاثي الفوسفات ATP نتيجة اكسدة مواد التفاعل الاولية المختلفة.

كما تحتوي الميتوكوندريا على رايبوسومات خاصة بها مشابهة لرايبوسومات البكتيريا.

البلاستيدات :- Plastids

وهي عضيات خلوية متخصصة توجد في سايتوبلازم الخلايا النباتية حقيقية النواة تختلف في شكلها وحجمها وتركيبها وعددها.

واهم هذه البلاستيدات واكثراها شيوعاً هي البلاستيدات الخضراء chloroplast تختلف في شكلها وعددها ففي الخلايا النباتية الراقية يكون شكلها عديسي او بيضوي أو كروي يتراوح قطرها من ٤-٥ ميكرون وطولها يصل حوالي ١٠ ميكرون. أو قد تكون حلزونية أو كأسية أو نجمية أو مفصصة كما في بعض انواع الطحالب. موقعها غير محدد في الخلية حيث تتحرك باستمرار في السايتوبلازم.

المكونات الكيميائية ٦٠٪ بروتين حوالي ٣٠٪ دهون و٧٪ صبغات و١-٥,١٪ RNA و١,٠٪ DNA .

تحاط البلاستيدة الخضراء بغشاء مزدوج من مواد ليبوبروتنية الاغشية الداخلية

تترتب بشكل صفائح تسمى بالثيلاكويد **Thylakoids** تترتب بشكل مجاميع يطلق على كل مجموعة اسم البذيرة **Granum** وتتصل كل بذيرة مع البذيرة الاخرى عن طريق صفيحة السدى **stroma thylakoids** ويتراوح عدد البذيرات في البلاستيدة الواحدة. من ٤٠-٦٠ بذيرة وتنغمر البذيرات في مادة الحشوة (السدى) **stroma** التي تحتوي على المادة الوراثية **DNA** وعلى الرايبوسومات تحتوي البلاستيدات على اصباغ خضراء اللون يطلق عليها اسم الكلوروفيلات **chlorophylls** واشباه الكاروتينات **carotenoid** صفراء-حمراء اللون.

تعد البلاستيدات الخضراء موضعاً لاهم التفاعلات البيوكيميائية حيث تحتوي على الآلية اللازمة لالتقاط الطاقة الضوئية وتحويلها إلى طاقة كيميائية تكون على شكل جزئيات **ATP** وهناك طاقة مختزلة اخرى تعمل على اختزال ثاني اكسيد الكربون إلى السكريات وترتبط عدد من الانزيمات المسؤولة عن العملية الاولى في البذيرات اما الانزيمات المسؤولة عن العملية الثانية فتكون موجودة في حشوة البلاستيدة **stroma**.

النــواة Nucleus

تتميز الخلايا حقيقية النواة بوجود تركيب كروي او بيضوي الشكل أو يكون مغزلي أو مفصص يطلق عليه اسم النواة.

تمتلك معظم الخلايا الحيوانية والنباتية على نواة واحدة ويكن بعضها يمتلك أكثر من نواة وبعضها لا يمتلك نواة في فترة من دورة حياتها مثل كريات الدم الحمراء. ويختلف موقع النواة فقد تكون مركزية أو محيطية ويتراوح حجمها من ٣-٢٥ ميكرون.

وعند فحص خلايا تحت المجهر الضوئي تبدو نواة الطور البيني Interphase مكونة من الاقسام التالية:

١- الغلاف النووي **Nuclear Envelope**

٢- العصير النووي **Nuclear Sap**

٣- الكروماتين **Chromatine**

٤- النوية **Nucleolus**

الغلاف النووي : وهو غشاء رقيق مزدوج وهو الحد الفاصل بين محتويات النواة والسايتوبلازم. وعند فحصه تحت المجهر الالكتروني وجد انه يتألف من غشائين مفصولين عن بعضهما بفسحة سمكها ١٠-١٥ميكرون يلتقيان بعدة مناطق مشكلة الثقوب النووية **Nuclear Pores** يختلف عددها باختلاف الحالة الفسيولوجية للخلية وهي ممرات لتبادل المواد بين النواة والسايتوبلازم .

العصير النووي : وهو مادة جيلاتينية تتألف من محلول غروي شبه سائل تنغمر فيه خيوط الكروماتين والنوية ويكون ضعيف الاصطباغ .

الكروماتين : يتألف من حلزون مزدوج من الحامض النووي **DNA** ترتبط معه بروتينات تسمى بالهستونات واللاهستونات يوجد نوعين من الكروماتين هما :

الكروماتين الحقيقي **Euchromatine** وهو الجزء الفعال من الناحية الوراثية ويكون على شكل خيوط رفيعة غير ملتفة وفاتح اللون.

الكروماتين المغاير **Heterochromatine** وهو جزء غير فعال من الناحية الوراثية يكون كثير الطيات ويصطبغ بشدة بالصبغات القاعدية .

وتشكل تجمعات الكروماتين تراكيب خيطية متشابكة تسمى بالصبغيات **chromosomes** (الكروموسومات) وهي المادة الاساسية للوراثه.

النوية : تبدو تحت المجهر الضوئي كجسم صغير كروي حبيبي كثيف متجانس

غير محاط بغشاء . يعتمد عددها وحجمها على نوع الفعالية البنائية للخلية فالخلايا ذات المستوى العالي من البروتين تكون نوياتها كبيرة الحجم وكثيرة العدد كما في خلايا البنكرياس وخلايا الفلق .

تتكون كميائيا من البروتين والحامض النووي الرايبوزي **RNA** يوجه بناء الـ **RNA** في النوية منطقة معينة على كروموسومات معينة تسمى بمنطقة تنظيم النوية.

تشخيص الاحماض النووية :-

يتم تشخيص الحامض النووي **DNA** بطريقة فولكن حيث يتم الحصول على الالديهدات من السكر بمعاملة الخلايا مع **IN Hcl** على درجة حرارة ٦٠مْ ولمدة ربع ساعه (تحلل مائي) ثم تعامل الخلايا مع كاشف شيف **Schiff** فيتكون لون أحمر ارجواني دليل على الـ **DNA** .

أو باستخدام صبغة أزور بـ (**Azur B**) حيث يتلون الـ **DNA** باللون الازرق المخضر في حين يتكون **RNA** باللون الارجواني .

الفصل الثالث

التركيب الكيميائي الجزيئي للاحماض النووية

الاحماض النووية
Nucleic Acids
التركيب الجزيئي الكيميائي

سميت هذه الاحماض بالنووية لانها اكتشفت لاول مره في النواة من قبل العالم ميشر **Miescher** حيث فصل من انوية الكريات البيض وحيامن السمك وقد وجد أن ٦٠٪ هي احماض نووية و٣٥٪ بروتينات و٥٪ دهون وسكريات واملاح .

الا انه ظهر فيما بعد ان الاحماض النووية موجودة في عضيات اخرى في السايتوبلازم ومثل الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء ولكنها بكميات أقل وكذلك البلازميات وهي قطع من الـ **DNA** في سايتوبلازم البكتيريا .

يوجد نوعان من الاحماض النووية هما الحامض النووي الذي او كسيرايبوز **(DNA) Desoxyribonucleic acid** أي منقوص جزيئة أوكسجين والحامض النووي الرايبوزي **(RNA) Ribonucleic acid** وفي خلية البكتيريا التي تعتبر مصدر هام للاحماض النووية وجد أنها تحتوي على ١٪ من **DNA** وعلى ٦٪ من ال **RNA**

الـ **DNA** يحمل المعلومات الوراثية والـ **RNA** يقوم بعملية تخليق البروتينات .

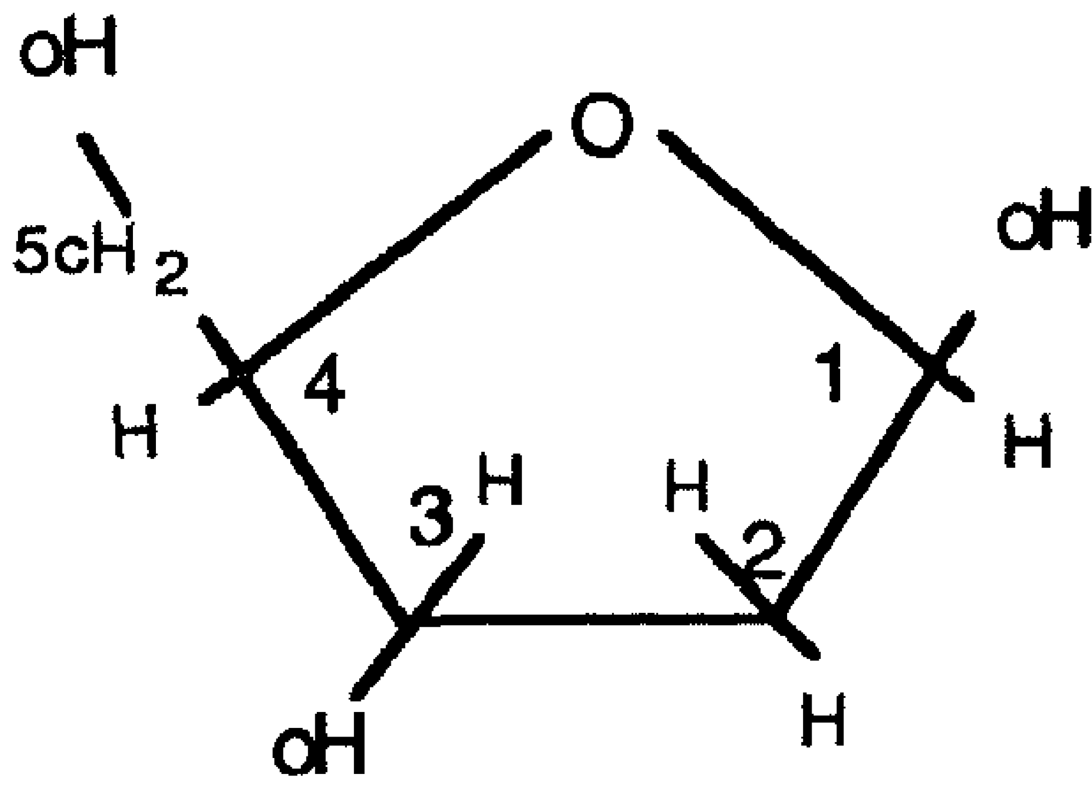
والاحماض النووية مواد عضوية ذات جزئيات كبيرة اكبر من جزئيات البروتينات ووزنها الجزيئي يبلغ حوالي البليون . تتألف من وحدات يطلق عليها اسم النيكليوتيدات **nucleotides** .

المكونات الكيميائية :-

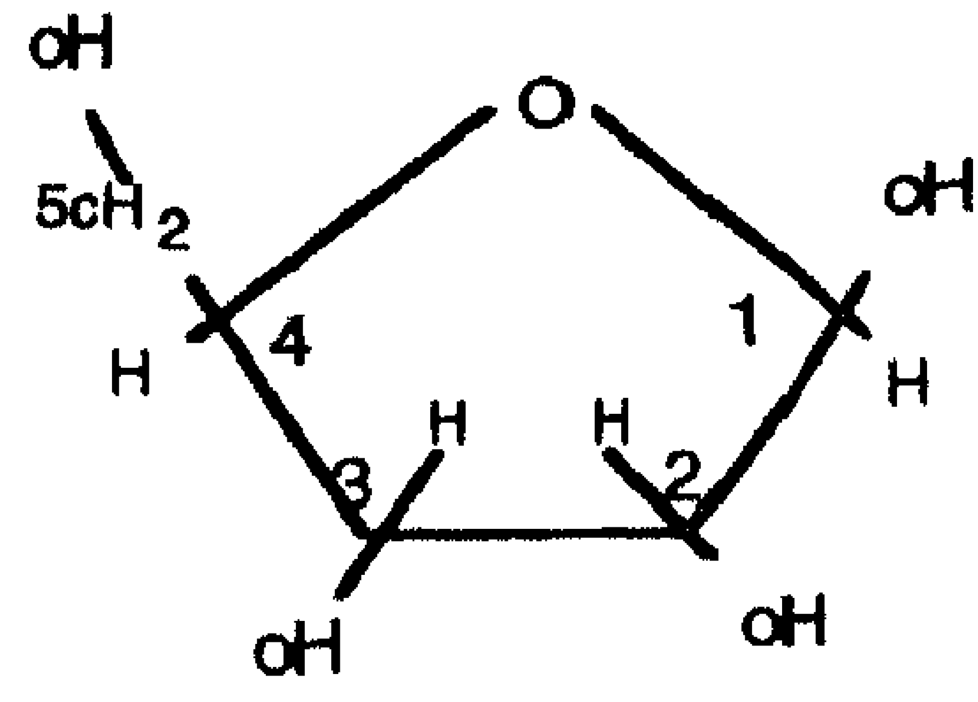
تتألف الاحماض النووية من وحدات يطلق عليها بالنيكليوتيدات كل وحدة تتكون من ثلاثة اجزاء هي :

أ- السكريات Sugars

وهو سكر خماسي ذرات الكربون pentose ويختلف الـ DNA عن الـ RNA في ان السكر الخماسي Ribose يكون منقوص الاوكسجين في الاول ($C_5 H_{10}O_4$) وذلك في موقع ذرة الكربون رقم ٢ الشكل (٣-١) يوضح التركيب البنائي لجزئيات السكر .



سكر الدي اوكسيدايبوز
(منقوص الاوكسجين على ذرة الكربون 2)

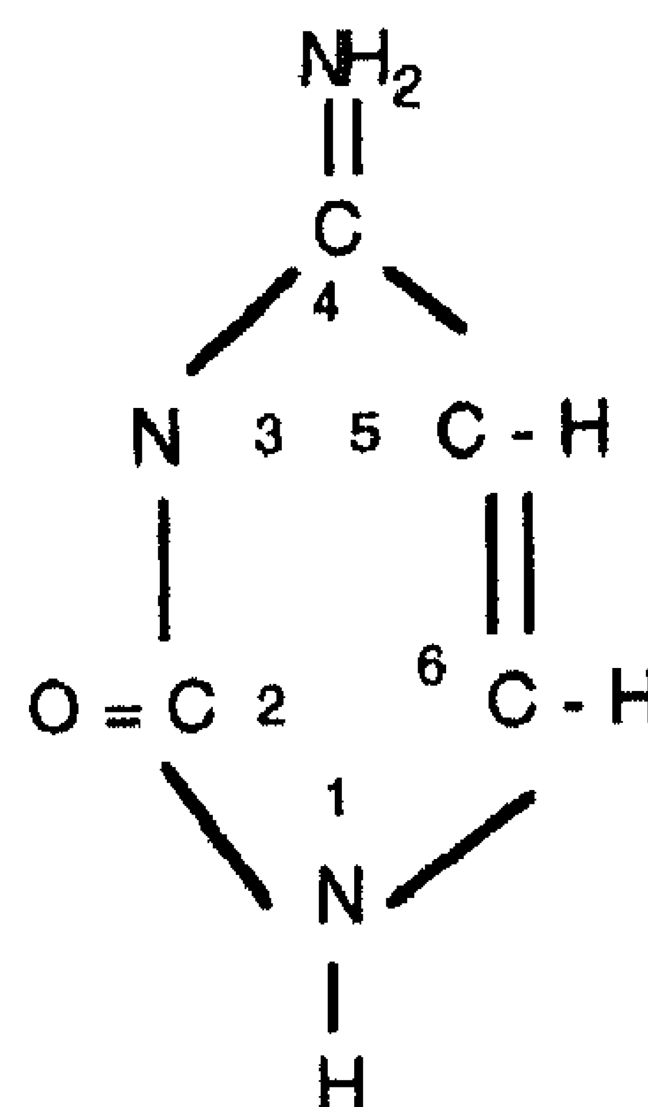


سكر الرايبوز

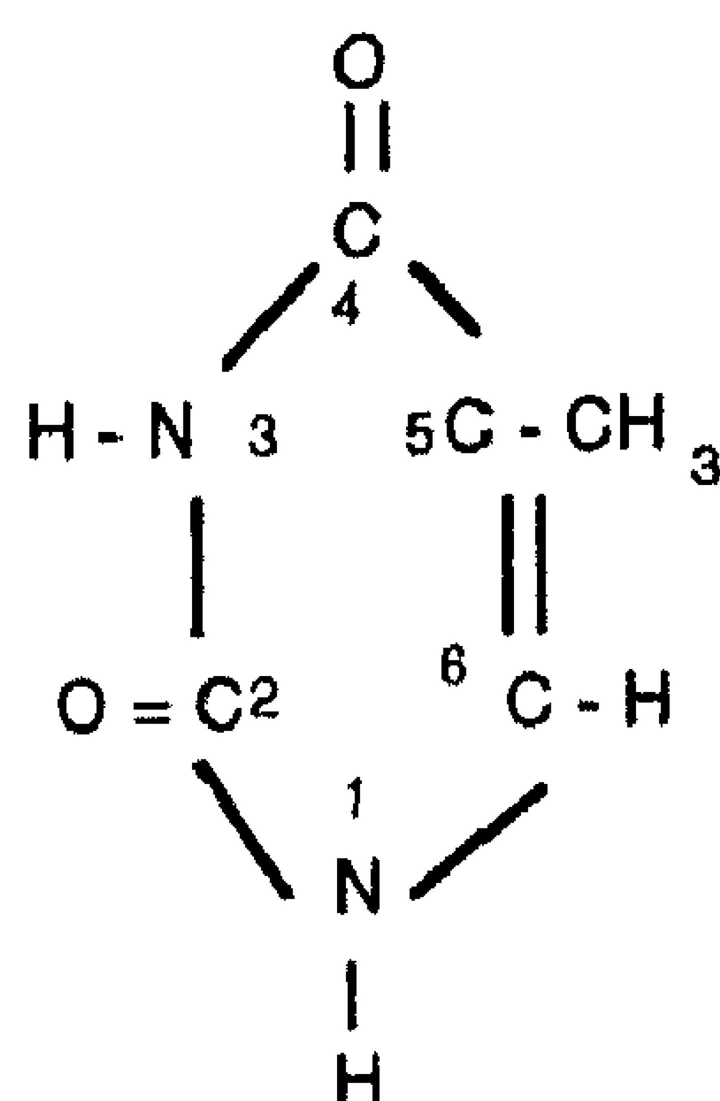
ب- القواعد النتروجينية : Nitrogenous Bases

وتتكون من نوعين مختلفين في التركيب والصفات الكيميائية احدهما ويطلق عليها بالبريميدنيات Pyrimidienes والتي تشتق من هيكل البنزين وهي حلقة سداسية حيث يحلN محل الـ CH في المكانين ١، ٣ ، كما في الشكل (٣-٢).

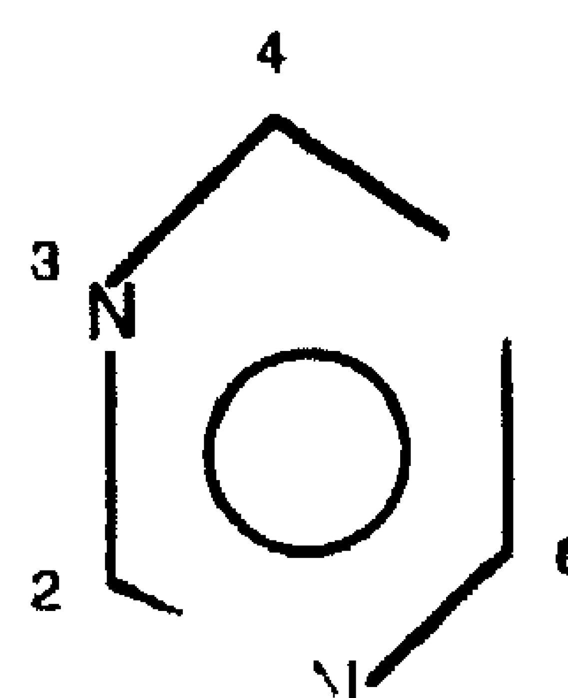
ويشتق منها الثايمين (T) **Thymine** واليوراسيل (U) **Uracile** والسايتوسين (c) **Cytosine** .

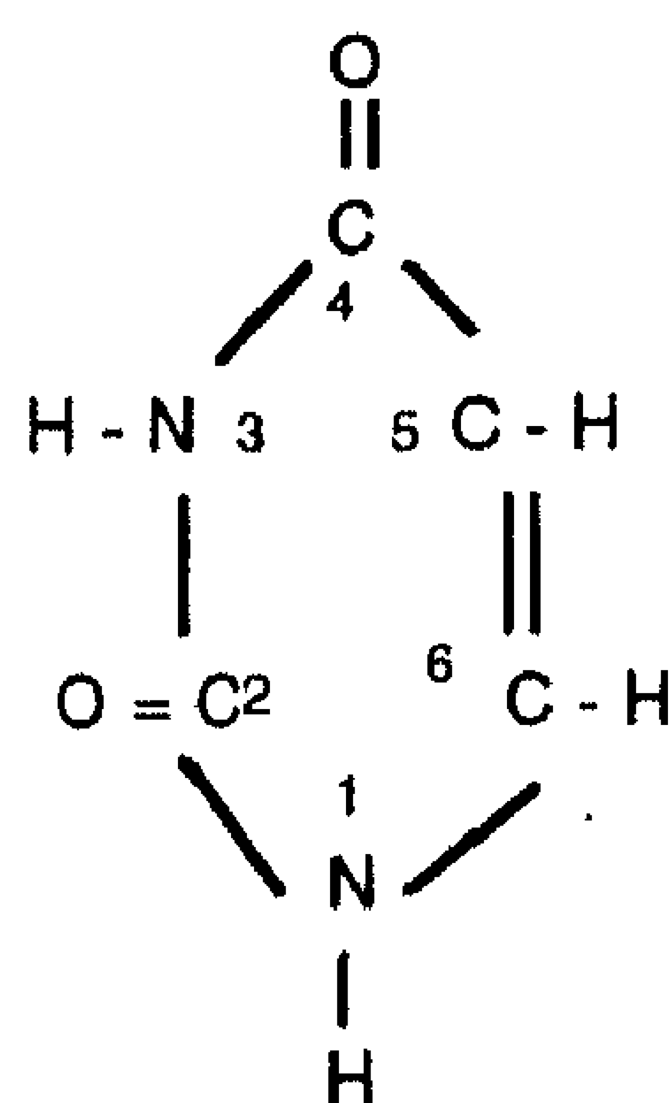


السايتوسين (2)



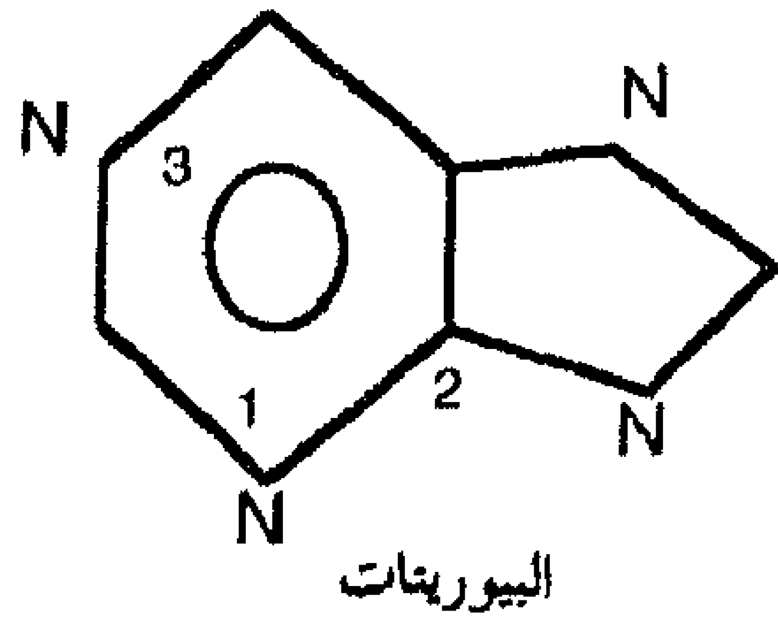
Thymine الثايمين



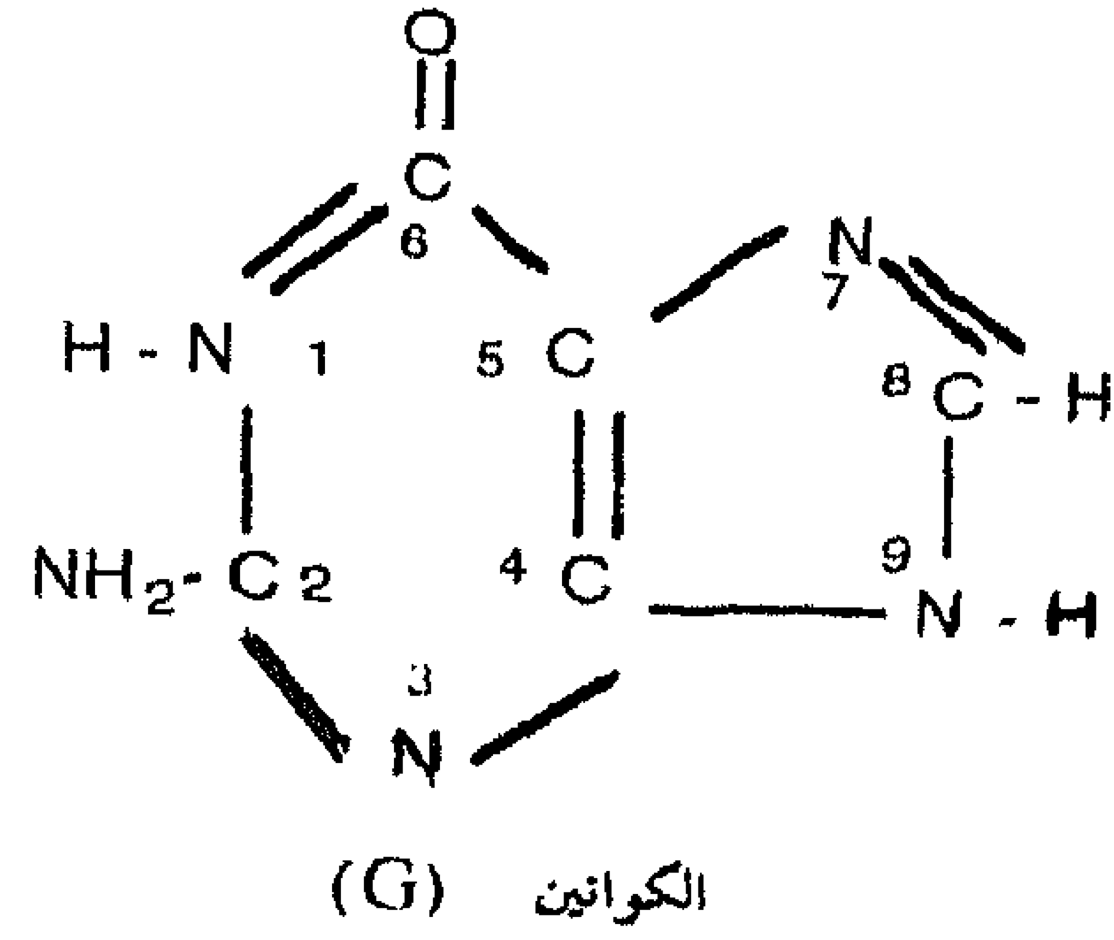


Uracil اليوراسيل

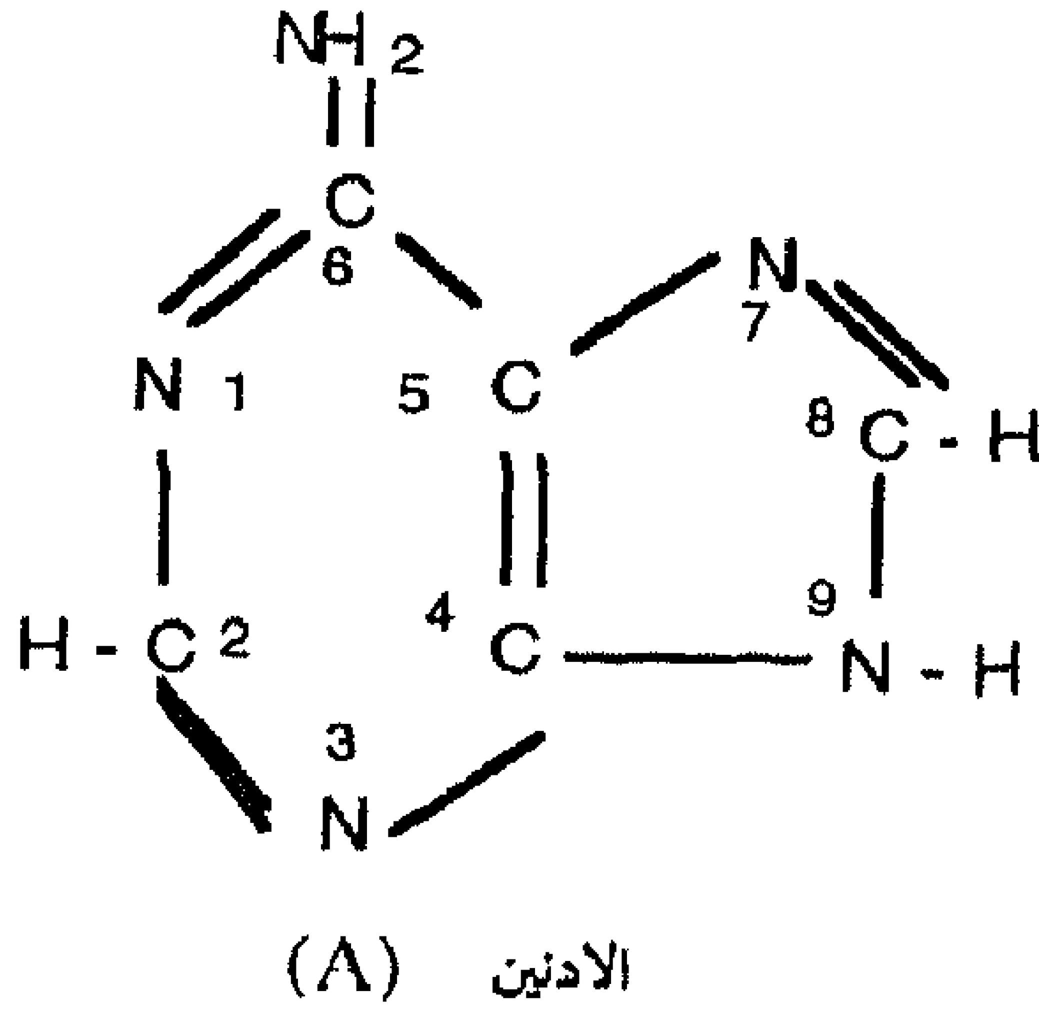
اما المجموعة الثانيه فيطلق عليها بالبيورينات **purines** وتتكون من حلقتين احدهما سداسية والاخرى خماسية **Heterocyclic** وتشتق منها الكواتين **Guanine** والادنين **Adenine** .



البيورينات



(G) الكوانين



(A) الادنين

وعند اتحاد السكر مع احدى القواعد النتيروجنية تتكون النكليوزيد **nucleoside** وتعرف بالنكليوزيدات الرايبوزية منقوصة الاوكسجين بالنسبة ال **DNA** بينما تعرف بالنيكليوزيدات الرايبوزيدية **Ribonucleosides** في الـ **RNA**.

فالـ **nucleosides** في الـ **DNA** هي دي اوكسي الثايميدين **Deoxy thymidine** والدي اوكس سيتدين **Deoxycytidine** تنتهي بالمقطع (**-dine**) بالنسبة للبريميدينات أما بالنسبة للبيورينات فينتهي بالمقطع (**-osine**) مثل الادينوسين **Adenosine** والكوانوسين **Guanosine** اما في (**RNA**) فهي السيتدين **cytidine** واليوريدين **uridine** والادينوسين والكوانوسين.

يرتبط السكر مع القاعدة النتروجينية بواسطة رابطة تساهمية كلايكوسيدية حيث

يرتبط الكربون رقم (١) في السكر مع النيتروجين رقم (١) في حالة البريميدينات كما في الشكل (٣-).

أما في حالة البيورينات فيحدث ان ترتبط ذرة الكربون رقم (١) في السكر مع ذرة النيتروجين في القاعدة رقم (٩).

تظهر مشتقات البيريميينات بانها تحتوي على الاوكسجين في الموقع (٤) على شكل كيتو **keto - form (0=c<)** كما في حالة الثايمين واليوراسيل اما في حالة السايتوسين فانه يمتلك في الموقع (٤) على مجموعة أمينية بدلاً من الكيتونية .

ويختلف الثايمين واليوراسيل في أن الاول يمتلك على مجموعة الميثان **(CH3)** في الموقع (٥) وهكذا فان الاختلافات بين مشتقات البريميدينات يحصل في المواقع (٥) و(٤).

اما بالنسبة للبيورينات فأن الادنين يحتوي عند المكان (٦) على المجموعة أمينية **(NH2)** بينما الكوانين يحتوي على مجموعة كيتونية **(0=c<)** بنفس الموقع . ويحتوي عل مجموعة أمينية في الموقع (٢) وبهذا تختلف مشتقات البيورينات في المواقع (٢)و(٦).

استخلاص الـ DNA من الخلايا :-

في البكتيريا يتم الاستخلاص بواسطة انزيم يدعى**lysozyme** أو استعمال المنظفات **Detergent** (كما في الشكل) ويترسب الـ **DNA** بواسطة الكحول باضافته الى محلول البكتيريا ثم يدخل قضيب خشبي أو زجاجي داخل الانبوبه وعند تحريكه يلتف الحامض النووي على القضيب .

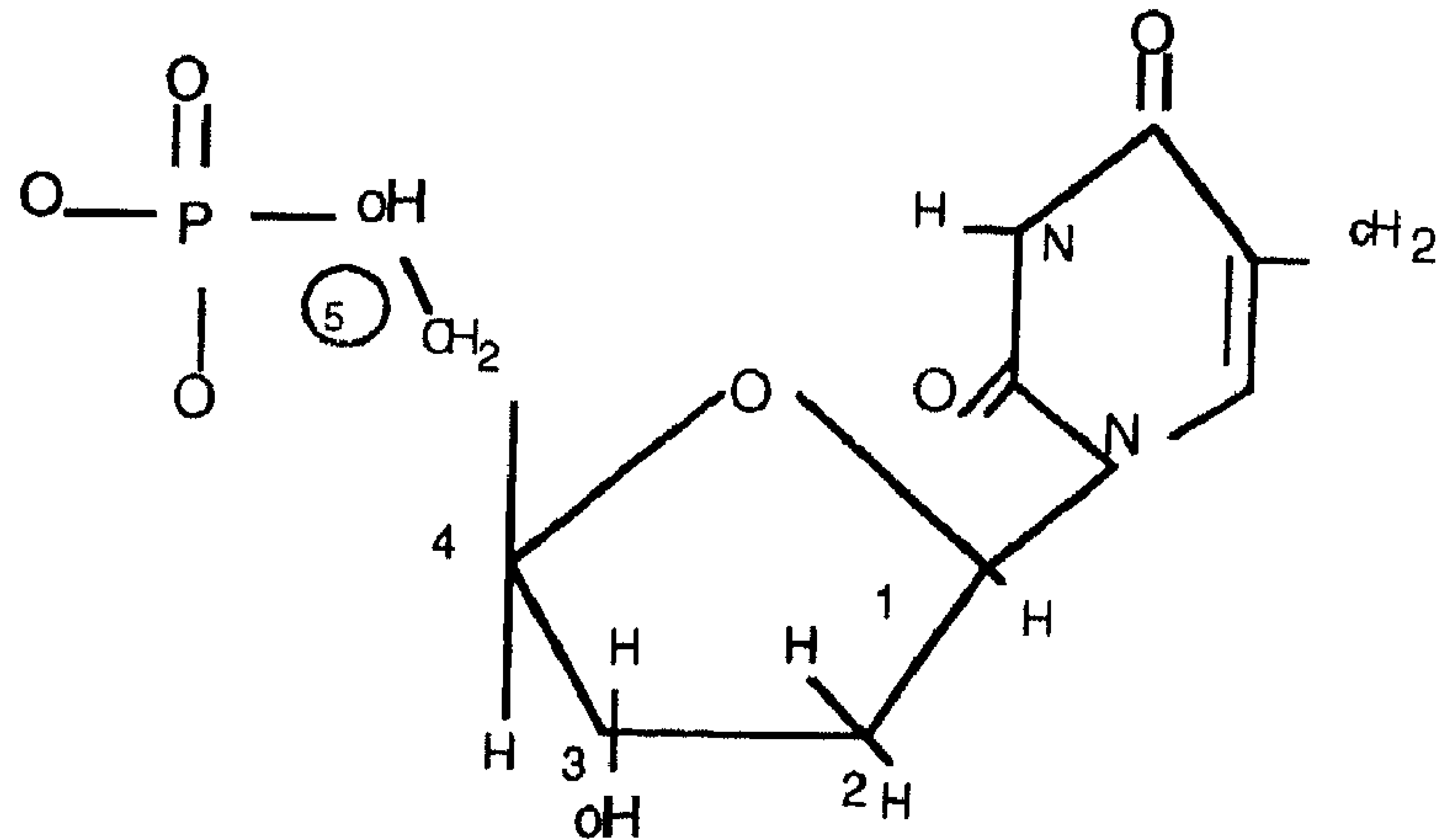
أما في خلايا حقيقية النواه (كالكبد مثلا) فيتم الاستخلاص بسحق الخلايا في هاون خزفي مع قليل من الرمل الناعم بعد اضافة محلول **Nacl** يطرد مركزيا بعد

ذلك لمدة ١٥ دقيقة في ٢٥٠٠ دورة في الدقيقة يؤخذ السائل الصافي ويضاف له ستة اضعاف حجمه من الماء المقطر (يضاف السائل الصافي للماء تدريجياً) مع التحريك المستمر بواسطة قضيب زجاجي فيلاحظ التفاف خيوط الـ **DNA** عليه. يمكن الكشف عنه باستخدام الكاشف ثنائي فينايل اميني **Diphenylamine** **(C6H5 - NH - C6H5)** الذي يعطي ناتج ذو لون أزرق .

جـ) مجموعة الفوسفات

ترتبط النيكليوسيدات مع مجموعة الفوسفات بوحدتي سكر متجاورتين عن طريق رابطة فوسفاتية ثنائية الاستر **phosphodiester** . فتصل بين كربون (٣) من احدى حلقتي السكر كربون ٥ من الوحدة التالية اذ يتم التفاعل بين مجموعة هيدروكسيل في الكربون ٥ من السكر مع مجموعة فوسفات بعد فقدان جزئية ماء وهي التي تعطي الخصائص الحامضية للجزيء.

وتبقى على مجموعة الفوسفات مجموعة بها هيدروجين قابل للتأين وهذا ما يحدث في الظروف الاعتيادية والسائدة في الخلية.



جدول (٣-١)

جدول (٣-١)

والجدول التالي يوضح النيكليوزيدات والنيكليوتيدات وأسمائها الخاصة :

القاعدة	نيكليوسيدات	نيكليوسيدات
في حالة DNA		
الادنين	دي اوكسي ادينوسين	دي اوكسي ادينوليك اسيد
الثايمين	ثيميدين	ثايميديك اسيد
السايتوسين	دي اوكسي سيتدين	دي اوكسي سيتيدليك اسيد
الكوانين	دي اوكسي كوانوسين	دي اوكسي كوانيلك اسيد
في حالة RNA		
اليوراسيل	يوردين	يورديلك اسيد
الادنين	ادينوسين	ادينلك اسيد
السايتوسين	سيتدين	سيتيدبلك اسيد
الكوانين	كوانوسين	كوانيلك اسيد

ترتبط النيكليوتيدات مع بعضها بواسطة آصرة فوسفاتية ثنائية الاسترلتكوين عديد النيكليوتيدات **Polynucleotides** .

يحتوي الـ **DNA** على القاعدة النيتروجنية الثايمين **(T)** وفي الـ **RNA** بدلا عنه يحتوي على القاعدة (اليوراسيل **(U)**) وهذا يوضح لماذا يستخدم الثايميدين مع النظير المشع بالنسبة لـ **DNA** واليوردين مع النظير المشع في حالة **RNA** عند دراسة تخليقها .

البناء الهندسي للـ DNA

يختلف تركيب الحامض النووي **DNA** بالنسبة للكائنات الحية فقد يتألف من سلسلة مفردة في بعض الفايروسات مثل فايرس ١٧٤× والعاثيات

(Bacteriophage) وهذه حالة بدائية وعندما تغزو هذه الفايروسات بعض الخلايا البكتيرية فانه يتضاعف في داخلها ويصبح مكونا من سلسلتين.

وفي جميع الكائنات الحية الاخرى فإن الـ **DNA** يتكون من سلسلتين حلزونيتين (حلزون مزدوج) (الشكل (٣-).

الحلزون المزدوج : DNA-double helix

من المعروف ان ال **DNA** يتكون من وحدات عديدة النيكلوتيدات وهو مؤلف هندسياً من سلسلتين بالتفاف حلزوني مزدوج. ولذلك فان له بنية ابتدائية مكونة من سلسلة واحدة فيها ترتبط الفوسفات مع السكر بالاتجاه(3َ ---> 5َ) وبالاتجاه المعاكس ترتبط الفوسفات مع السكر بالاتجاه (5َ ---> 3َ) وبسبب هذا الاختلاف فان سلسلة الـ **DNA** تدعى بالقطبية.

وتستخدم البنية الابتدائية هذّه في عمليات الاستنساخ وعملية التضاعف. حيث تعمل احدى السلسلتين في عملية الاستنساخ في تسخ جزئي الـ **RNA** المطلوب لعملية الترجمة .

بينما تعمل سلسلة **i** كقالب في عملية التضاعف. ويوجد الحامض النووي **DNA** ذو السلسلة المفردة في بعض الفايروسات (١٧٤×) وبعض العائيات. أما البنية الثانوية الـ **DNA** والتي فيها يتألف الـ **DNA** هندسيا من حلزون مزدوج كما في النموذج الذي اقترحه كلاً من واطسن وكريك **watson and crick** عام ١٩٥٣ اللذين استندا في ذلك على دليلين هامين هما :

١ - القواعد التي وضعها **chargaff** عام ١٩٥٠ ومساعديه عندما قاموا بتحليل الـ **DNA** لعدد من الكائنات الحية والتي تنص على أن :

أ- ان كمية الثايمين **(T)** مساوية دائما لكمية الادنين **(A)**

ب- كمية الكوانين (G) مساوية دائما لكمية السايتوسين (c)

جـ- ان كمية البيورينات مساوية في الكائن الحي لكمية البريميدينات وان النسبة بينهما مساوية إلى واحد بمعنى أن $A + G / T + C = 1$

٢- المعلومات التي وجدها كلا من ويلكنسن وفرانكلين wilkins and franklin باستخدام الاشعة السينيه X-ray crystallography عن تركيب ال DNA .

ومن هذه المعطيات اقترح واطسن وكريك التركيب اللولبي المزدوج والذي امكن بواسطته تفسير جميع الحقائق المعروفة ومن الخصائص التي يتصف بها ال DNA مايلي :

١- يتكون جزيء الـ DNA من سلسلتين تلتفان حول محور Axis عام تسمح بالدوران من اليسار الى اليمين right-handed

٢- القواعد النيتروجينية مرتبة بحيث تكون مكملة complementary بعضها البعض ومتأصرة بواسطة روابط هيدروجينية فالادنين يقابل الثايمين بواسطة آصرتين ويقابل الكوانين السايتوسين بواسطة ثلاث آواصر.

٣- يشكل السكر والفوسفات دعامتي السلم بينما تشكل القواعد درجات السلم.

٤- الالتفاف يكون بشكل طيات تحتوي كلا منها على عشرة قواعد نتروجينية وتشكل كل طية حوالي ٣٤ انكستروم.

٥- يبلغ قطر جزيء الـ DNA حوالي ٢٠ انكستروم.

٦- تساهم كل زوج من القواعد بحوالي ٣٦° درجة في دورة العشرة ازواج القواعد البالغة ٣٦٠° درجة .

٧- يحتوي جزيئ الـ **DNA** على اخدودين احدهما كبير **Major groove** والآخر صغير **Minor groove** كما في الشكل (٣-   ).

ويتم الارتباط بين القواعد النيتروجينية في جزيء الـ **DNA** وفقاً لعاملين اثنين هما :-

١- عامل هندسي :

ويتمثل بطول الرابطة وهذالا يتحقق الا بارتباط جزيء البيورين الكبير مع جزيء البريميدين الصغير فلو كان الارتباط بين جزئيات البيورينات لكانت الرابطة أكبر من المطلوب ولو كان الارتباط بين جزئيات البريميدينات الصغيرة فأن الرابطة تكون أصغر من المطلوب.

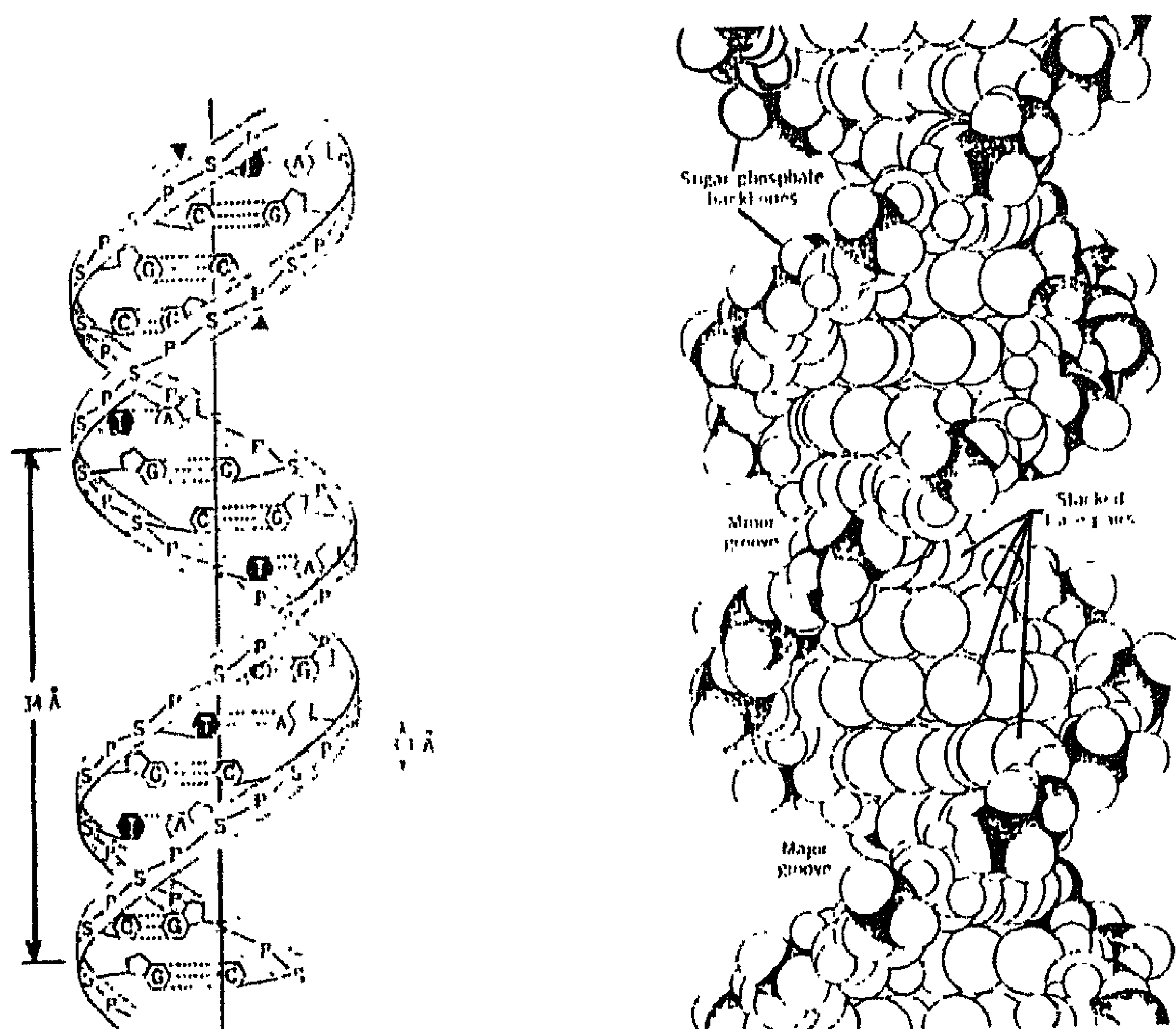
٢- عامل كيميائي :

وفيه يتم ارتباط الادنين الحامل لمجموعة أمينية في الكربون (رقم ٦) مع الثايمين الحامل لمجموعة كيتونية في الكربون (رقم ٤) .

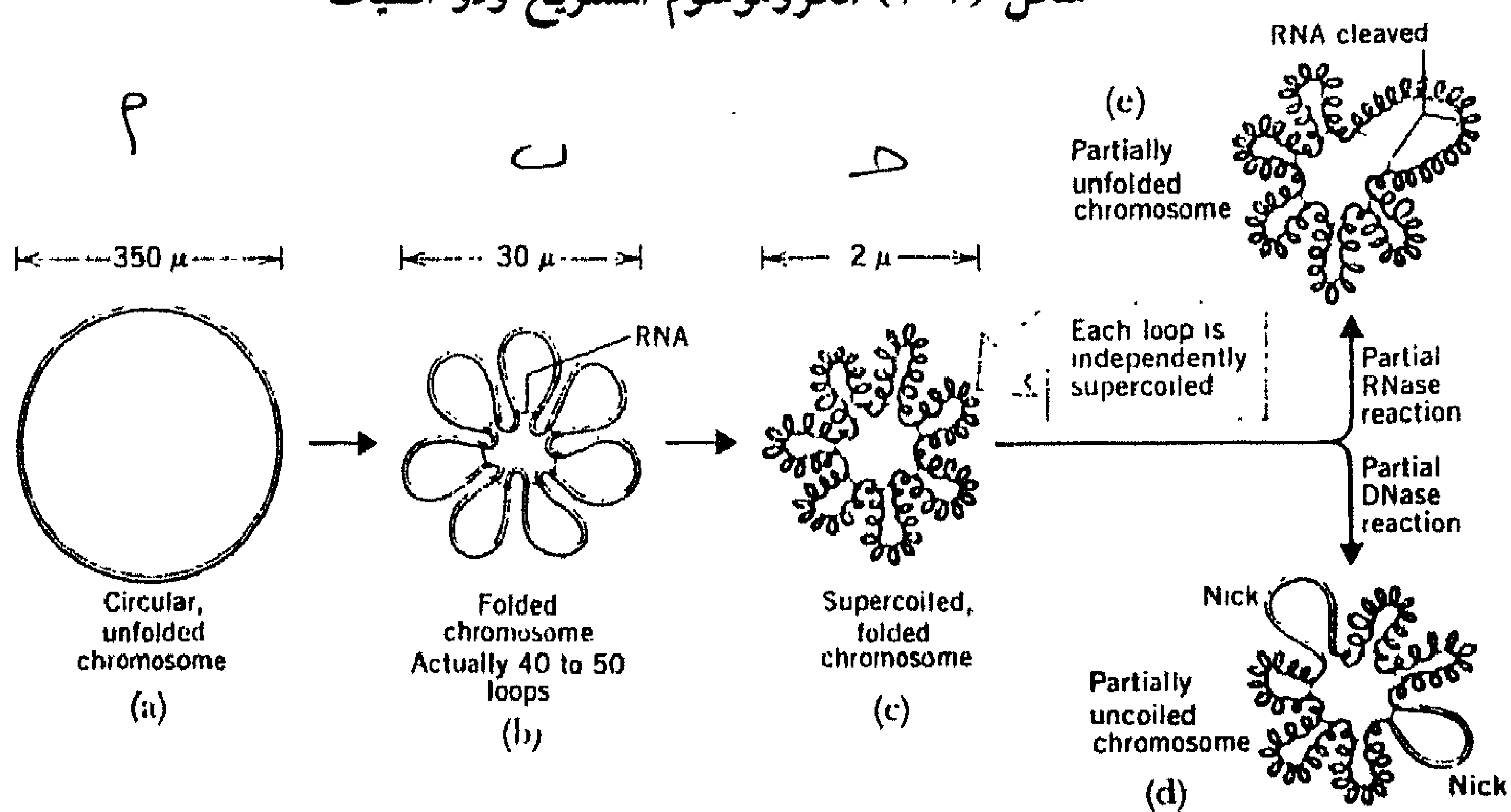
وبهذا يتطابق مجموعة الامين مع المجموعة الكيتونية في الكربون (رقم) كشرط للارتباط .

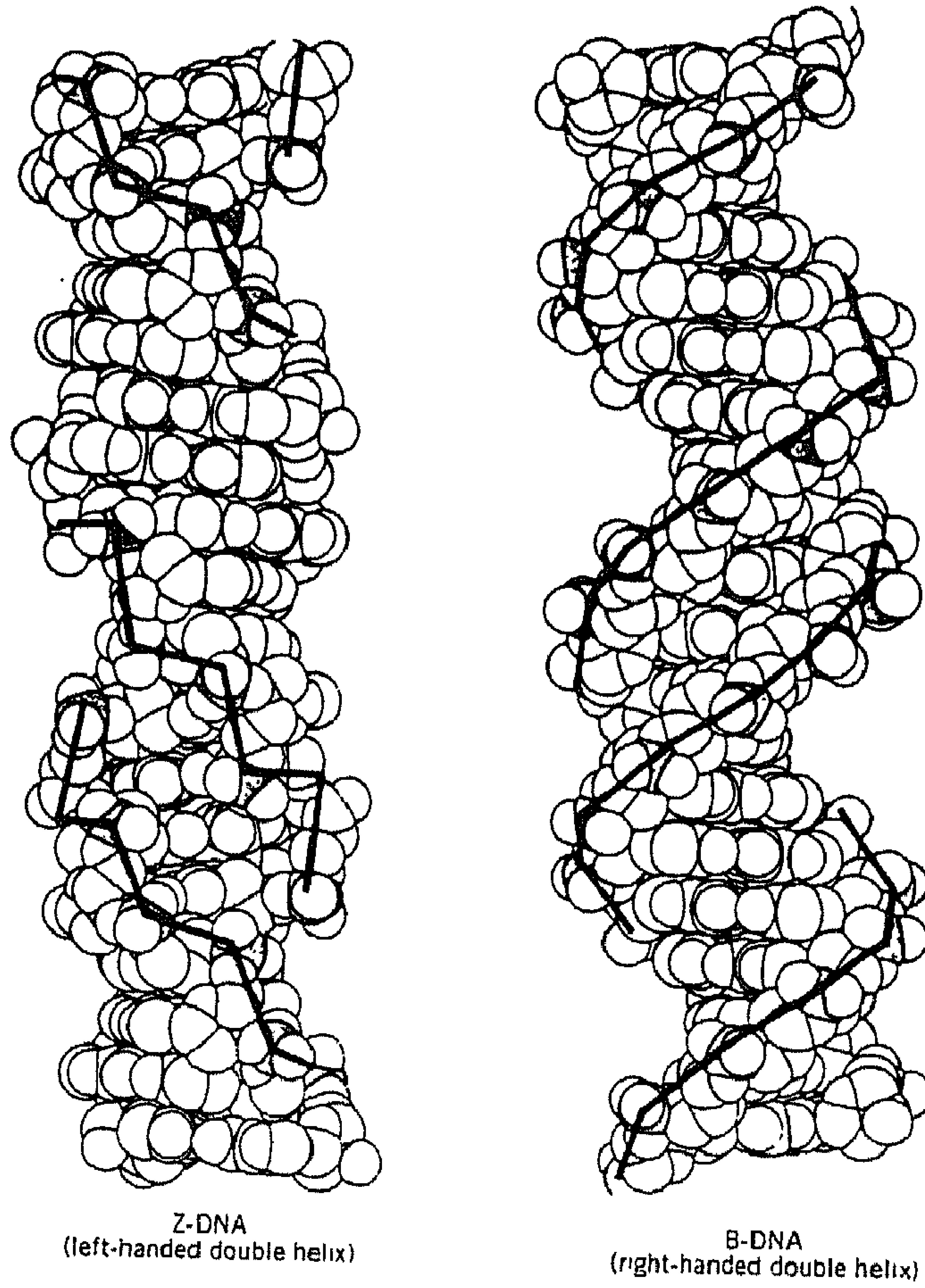
كما يتطابق الكوانين مع السايتوسين بوجود مجموعة كيتونية في ذرة الكربون (رقم ٦) في الكوانين تطابق مجموعة أمينية في الكربون (٤) من السايتوسين كما توجد مجموعة أمينية في ذرة كربون (رقم ٢) في الكوانين تطابق مجموعة كيتونية في ذرة الكربون (٢) في السايتوسين وبهذا يرتبطان بثلاث روابط هيدوجينية بينما يرتبط **(T)** مع **(A)** برابطتين .

شكل (٣-١) التركيب الحلزوني المزدوج الـ DNA



شكل (٣-٢) الكروموسوم المستريح وذو الطيات





شكل (٣-٣) يبين تركيب الـ DNA اللف لليمين (شكل B)
واللف لليسار (شكل Z)

هيئة الحلزون المزدوج Double-helix conformation

يوجد الحلزون المزدوج ال DNA على عدة اشكال وهذه الاشكال ناتجة من التغيرات البيئية المحيطة:

١- الشكل **B** وهو الشكل الذي اقترحه واطسن وكريك الآنف الذكر. حيث تحتوي كل طية على ١٠،٤٪ نيكليوتيد .

٢- الشكل- **A** عند زيادة تركيز الاملاح بشكل عالي في البيئة يوجد الـ **DNA** بهذا الشكل وتتألف كل طية من ١١ نيكليوتيدة .

٣- الشكل- **C** وفيه تكون كل طية مكونة من تسعة نيكليوتيدات ويطلق على الاشكال الثلاثية هذه بذات اللف اليميني **R hight handed** او اللف الموجب **positive coiling** .

٤- حديثا وجد شكل آخر من اشكال الـ **DNA** وهو ما يطلق عليه الشكل **Z** واللف يكون يساري **left-hand** والحرف **Z** يأتي من كلمة **zigzag** (المتعرج بالنسبة لتركيب العمود الفقري من السكر والفوسفات المتعرجة) ويحصل هذا عندما تكون تركيز الاملاح في البيئة المحيطة عالية . ان الاختلافات التركيبية في جزئيات الـ **DNA** تلعب دوراً هاما من النواحي البيولوجية .

يتخذ الحامض النووي **DNA** اشكالا مختلفة تبعاً لنوع الكائن الحي وكما يلي : **DNA– shape**

١- الخطي ذو الشريط المفرد .

ويتكون من سلسلة مفردة من النيوكليوتيدات ذات نهايتين (3َ) و (5َ) ويمكن أن يكون شريطا دائريا بواسطة الانزيم الرابط الـ **ligase**

٢- الخطي ذو الشريط المزدوج .

ويوجد في الفايروسات والعاثيات وبكتريا القولون وفي بعض عضيات الخلية مثل الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء .

يتكون هذا النوع من سلسلتين متضادتين في الاتجاه يتمم بعضهما بعضاً ويمكن بواسطة الانزيم الرابط **Ligase** أن تلتحم النهايتين (3َ) و (5َ) لتكوين الشكل الدائري المزدوج المغلق .

٣- الدائري المزدوج فائق اللف

وفيه يلتف الحامض النووي DNA الدائري المزدوج المغلق لفاً ثانوياً ويمكن ان يلتف لفا ثالثيا فيتكون من ذلك حلزون فائق اللف super coiled helices الذي يتصف بكثافة عالية ويكون اللف موجب في الحلزون اليميني او سالب في الحلزون باتجاه اليسار.

تغير طبيعة الحامض النووي DNA الدنترة Denaturation of DNA

يعاني الحامض النوي DNA تغيراً في طبيعته كما هو الحال في البروتينات ويتحول ال DNA من الشكل الحلزوني الفعال إلى الحامض النووي العادي غير الفعال .

ومن العوامل التي تعمل على تغيير في طبيعية الـ DNA هي العوامل الكيميائية مثل الاحماض والقواعد واليوريا والفورمالديهايد وعوامل فيزيائية كأرتفاع درجات الحرارة والتي تقلل من صلابة الحلزون

ان التغير في طبيعية الـ DNA كالكثافة واللزوجة واطياف الامتصاص ويرافق عملية التغير هذه زيادة في الكثافة الضوئية Optical Density (O.D) للحامض النووي والسبب يعود إلى انفصال الشريطين عن بعضهما وبالتالي زيادة تركيز المادة التي تسبب زيادة في الكثافة الضوئية .

ويمكن فصل الشريطين بواسطة الحرارة وتسمى هذه العملية بالانصهار melting ويمكن تتبعها بالقياس بواسطة جهاز الطيف الضوئي عند طول موجة (٢٦٠ نانومتر) وعادة يكون تكسير ازواج القواعد النيتروجينية (G-C) يحتاج إلى حرارة أعلى من تكسير القواعد (A-T) وذلك لان الأولى ذات ثلاث روابط هيدروجينية ونقطة الانصهار melting point تعتمد على النسبة GC\AT .

ويمكـن اعادة ال DNA إلـى طبيـعتـه الاصليـة بواسطـة التـبريد الـبطـيء أو درجة الحموضة الواطئة (PH).

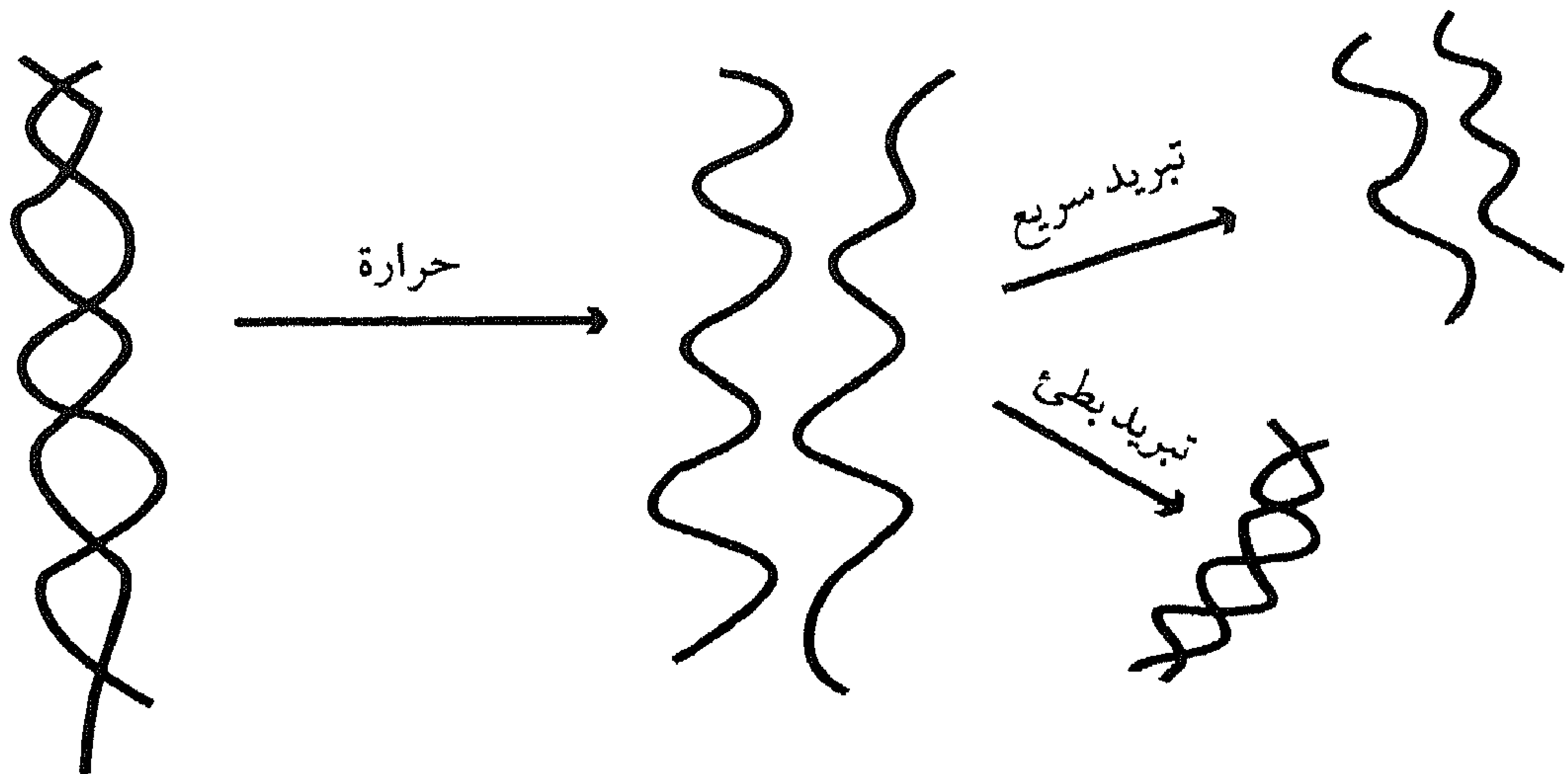
وتسمى هذه العمليـة بالـ Renaturation وهي عمـلية مهمـة في دراسة علم الأحياء الجزيئي في عمـليات التهجين Hybridization بين الـ DNA لنوعين من الكائنـات الحية . كما انها تستخدم للتهـجين مع الـ RNA لمعرفة اي جزء من الـ DNA يستعمل كقالب Template لانواع الـ RNA .

وتستعمل عمليات التهجين في كثير من الدراسات التطبيقية مثل

أ- تعيين الطفرات الـوراثية الحاصلة عن طريق الاضافة لنكـيوتيد واحد أو اكثر حيث تتغير الشفرة الوراثية للمعـلومات في الـ m-RNA وبالتالي يتغير البروتين المبرمج عند تكوينه .

ب- تعيين الطفرات الوراثية الحاصلة عن طريق النقصان لاحد النيكليوتيدات أو أكثر حيث يتسبب تغيير في الشفرة الوراثية ومن ثم تغيير في البروتين المتكون .

جـ- الـتوافـق الوراثـي بين الانـواع أو الضـروب strains وتسـتخـدم لهـذا الغرض طريقـة ساوثرن southern وذلك بتثبيث شـريط الـ DNA على ورق ترشيح نايتروسلليلوزي ثم اضافة اشرطة موسومة بنظير الهيدروجين 3' (تريتيوم H3) بالثايمين (T) ورؤية المـناطق غير المهجنة والتـي تتصف بتكوين انبعـاجات عن طريق المجهر الالكتروني.



شكل (-) يوضح إنصهار الدنا وأعادة اتحاد الشريطين

الحامض النووي الرايبوزي Ribonucleic Acid (RNA)

تحتوي كل خلية على ثلاثة انواع من الحامض النووي الرايبوزي **RNA** وهي مختلفة من حيث التركيب والوظيفة وهي :

الناقل **(trans fer) t- RNA**

الرسولي **(messenger)m-RNA**

الرايبوسومي **(ribosomal)r-RNA**

يختلف الـ **RNA** عن الحامض النووي **DNA** ببعض الخصائص الهامة وهي :

١- يتألف من سلسلة مفردة مستقيمة من الجزيئات .

٢- القواعد النيتروجينية هي الادنين والكوانين والسايتوسين واليوراسيل (بدلاً من الثايمين).

٣- السكر الموجود في الـ **RNA** هو الرايبوز (خماسي ذرات الكربون) .

٤-لا تتبع جزئيات الـ **RNA** الى قواعد جاركاف **chargaff**

٥- ترتبط النيكليوتيدات ببعضها بروابط فوسفوثنائية الاستر **phospho-diester** في الموقع (3َ) مع الموقع (5َ) وبذلك يعتبر الـ **RNA** جزئي بوليمر **polymer** .

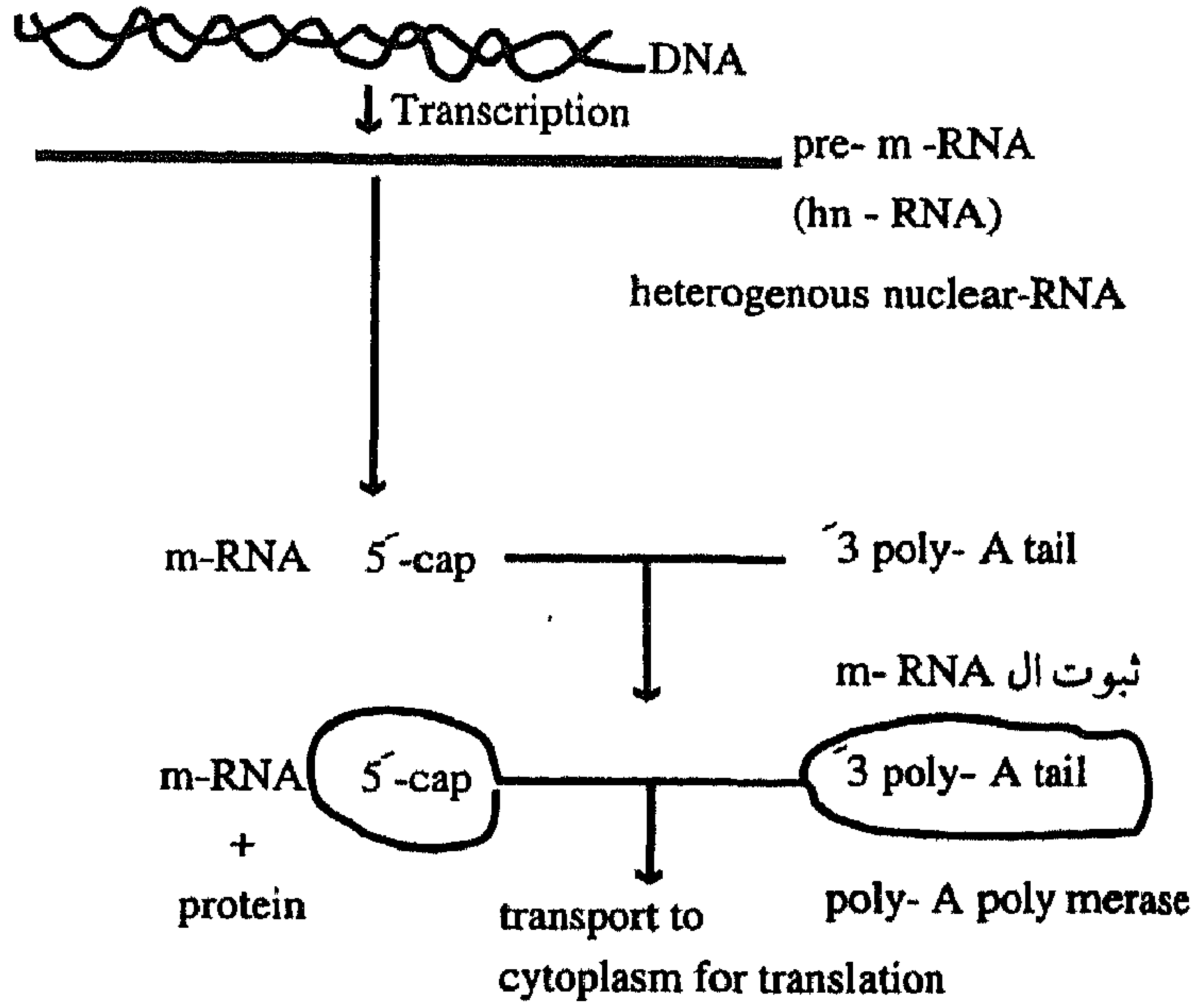
التنظيم الهندسي :-

أ- الرنا الناقل : **t-RNA**

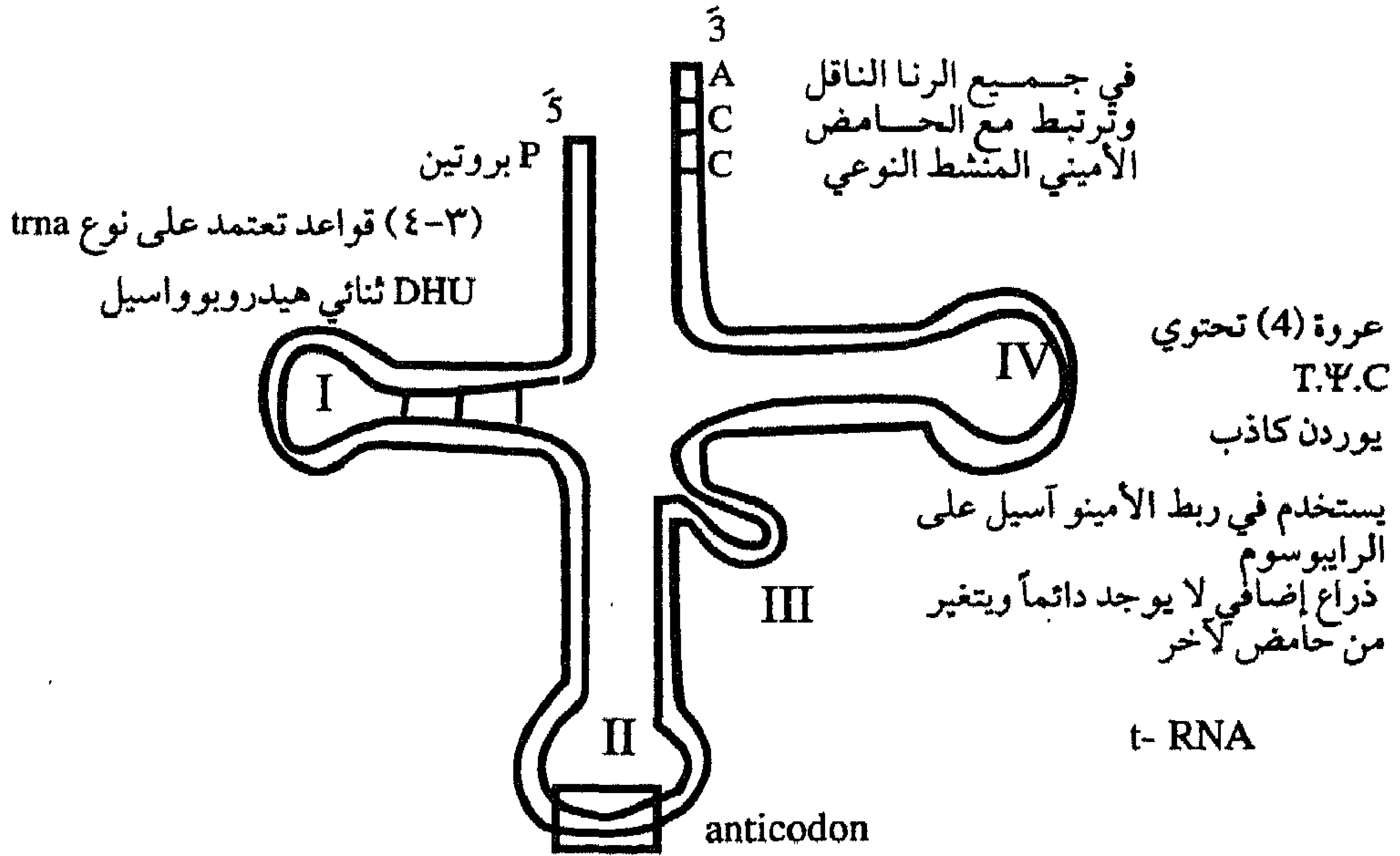
يتألف الرنا الناقل من سلسلة قصيرة تحتوي على ٧٥-٩٠ نيكليوتيدة ويبلغ وزنه الجزئي حوالي ٢٥٠٠٠ دالتون ويشكل حوالي ١٥٪ من كمية الرنا الموجودة في الخلية ويوجد اكثر من ٢٠ نوع وقد تمكن **Holley** هولي عام ١٩٦٥ ومساعديه من معرفة تتالي نيكليوتيدات الرنا الناقل للألنين في الخميرة ، ويبلغ نصف العمر للرنا الناقل في الخلايا حقيقية النواة حوالي ٦٠ ساعة .

قد أوضحت الدراسات باستخدام انكسار الاشعة السينية الشكل الفراغي للرنا ثلاثي الابعاد .

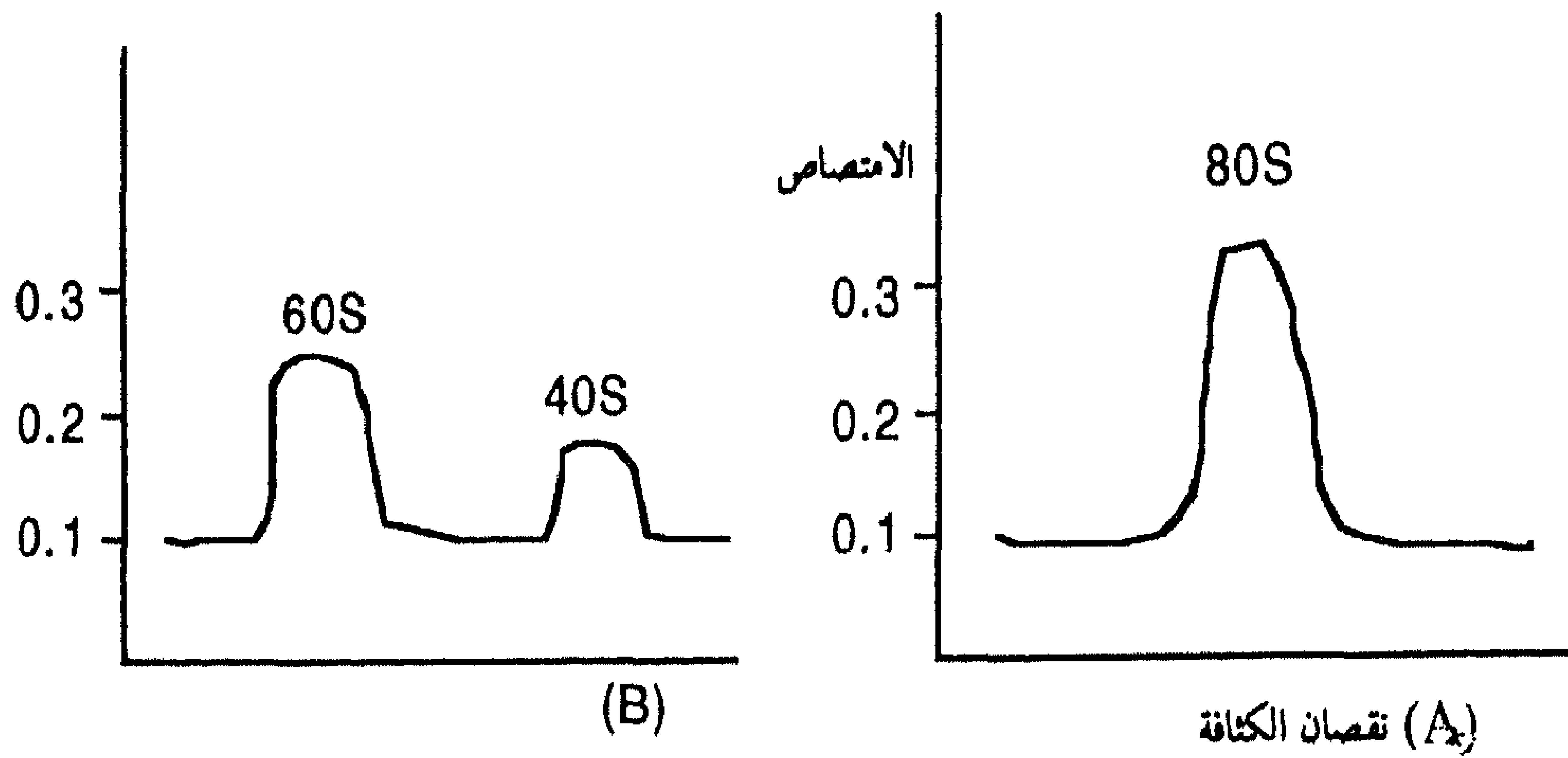
كما وجد عدد من الباحثين ان الرنا الناقل يتألف من سلسلة قصيرة منطوية حول نفسها لتشكل ثلاثة الى اربعة عرى وذراع تعتمد على نوع وعدد وتتابع النيكليوتيدات مشكلة تركيب يشبة ورقة البرسيم **cloverleaf** هناك عدد من الخصائص التي تميز هذا الشكل وهي :



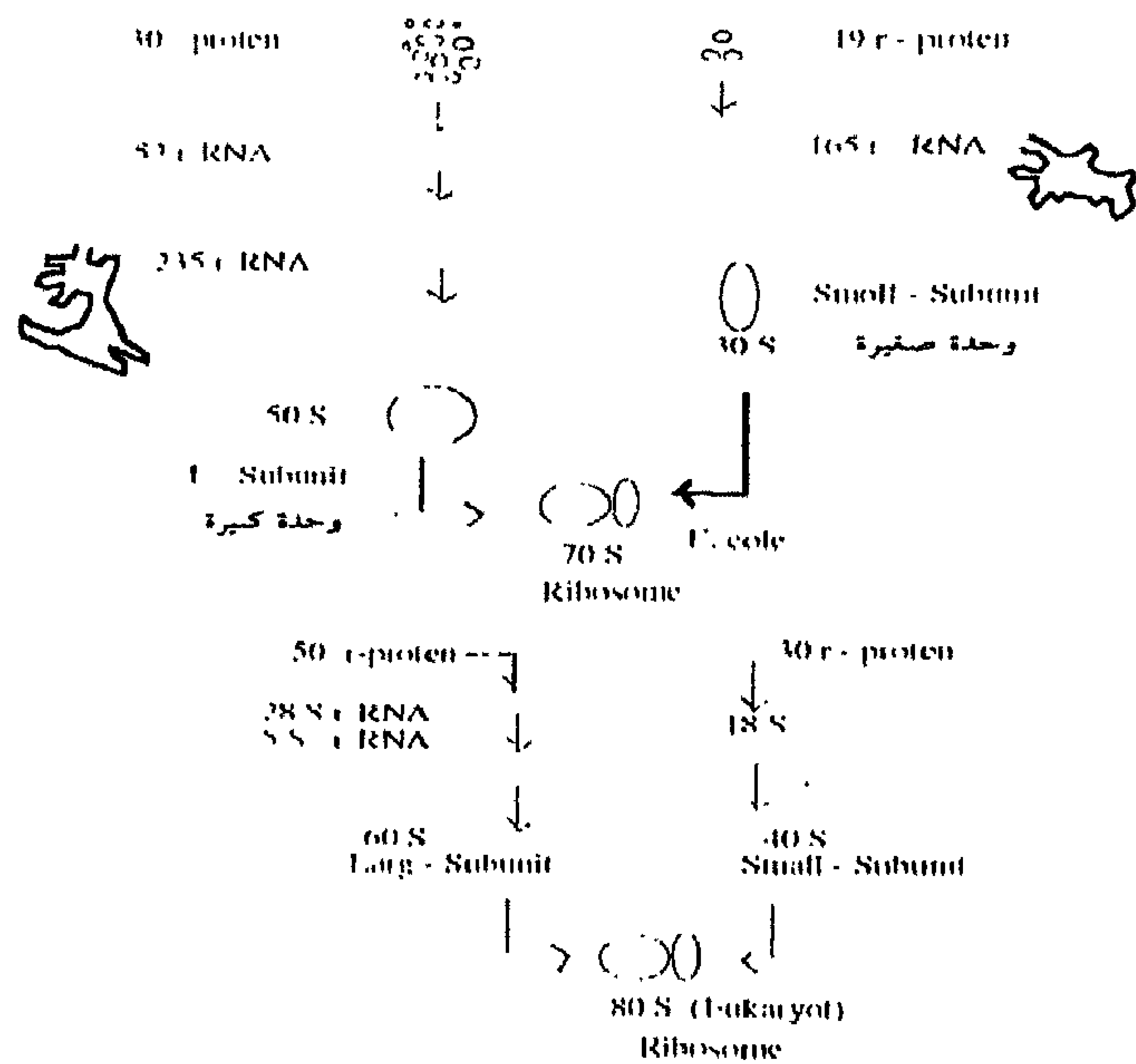
الشكل (٣-٤) يوضح استنساخ الـ m- RNA ومعالجته في حقيقية النواة



الشكل (٣-٥) يوضح بناء الرنا الناقل



شكل (٣-٦) الطرد المركزي لرايبوسومات في بادرات البازليا (80S) (A) وعند سحب أيون (Mg++) تتكون الوحدات 40S و 60S



شكل (٣-٧) الرايبوسوم في حقيقية النواة

١- النهاية (3َ) تحمل في نهايتها على التتالي **C-C-A** وهي مميزة لكل انواع الرنا الناقل .

٢- العروة الاولى وتعرف باسم عروة ثنائي هيدروبوراسيل **DHU** (تعتمد على نوع **t - RNA**) .

٣- العروة الثانية وهي عروة الشفرة المقابلة **anticodon** تحتوي على **triplate** (ثلاثية) تختلف من حامض الى آخر وتقابل الشفرة المناسبة له في قالب الرنا الرسولي لكي يوضع الحامض الاميني المنشط في المكان المبرمج له وراثياً في سلسلة البروتين .

هناك ذراع رقم **III** كما في الشكل (٤ -) وهذا لا يوجد دائما ويتغير كذلك من حامض الى آخر .

٤- العروة الثالثة (رقم **IV**)

والتي تحتوي على الثميدين - يوردين الكاذب - السيتوسين (**T&C**) تستخدم في ربط الامينو آسيل الرنا الناقل على جسيمة الرايبوسوم .

ومن الجدير بالذكر فان لكل رنا ناقل جين نوعي في بدائية وحقيقية النواة . تعمل الانواع المختلفة من الرنا الناقل على ترجمة المعلومات الوراثية المحمولة على **m - RNA** الى احماض أمينية في سلسلة الببتايد .

ب - الرنا الرسولي : **m - RNA**

يتألف جزء الرنا الرسولي من سلسلة مفردة وزنه الجزيئي حوالي ٥٠٠,٠٠٠ وهو متغير من ناحية الحجم والثبوت ويشكل حوالي ٥٪ من كمية الرنا الموجودة في الخلية وهو الحامل للمعلومات الوراثية من جزيئ الـ **DNA** الى الرايبوسومات التي تحصل عليها عملية تصنيع البروتين ويشكل معها ما يعرف بالجسيمات المتعددة **polysomes** في السايتوبلازم (**m - RNA + ribosomes**) ويستنسخ

الـ **m-RNA** من الـ **DNA** وبالاتجاه(3َ <--- 5َ) حيث تحصل الاطالة من النهاية (3َ) ويتصف جزيء الرنا الرسولي ببعض المزايا الكيميائية في خلايا حقيقية النواة اذ تحمل النهاية (5َ) قبعة **cap** من الميثايل كوانوسين .

أما النهاية (3َ) فتحتوي على ذيل من متعدد الادنوسين **Poly-adinosine (Poly-A)** ومن الجدير بالذكر فان **m- RNA** المسؤول عن تخليق الهستونات (بروتينات نووية) تكون خالية من الـ **poly - A** كما ان ليس جميع الـ **m-RNA** تحتوي تركيب القبعه الشكل (   ).

جـ - الرنا الرايبوسومي : **ribosomal - RNA (r RNA)**

يشكل الرنا الرايبوسومي حوالي ٧٥ - ٨٠٪ من كمية الرنا في الخلية ووزنه الجزيئي يبلغ بضع ملايين .

ويمكن تمييز ثلاثة انماط من الرنا الرايبوسومي خفيفة ومتوسطة وثقيلة .

ومن المعروف ان الرنا الرايبوسومي يرافقة دائما بروتين تركيبي في تكوين الرايبوسومات حيث يشكل حوالي ٦٠ - ٦٥٪ بينما يشكل البروتين حوالي ٣٥ - ٤٠٪ . فالرايبوسوم في بدائية النواة يتكون من وحدتين ثانويتين لها معامل ترسيب وحدة **(70s)** سفيدبرك **30s & 50s (svedberg unit)**

فالوحدة الكبيرة **50s** تتكون من وحدتين **23s & 5s** وسلسلة بيبتيدية من حوالي٣٠ بينما الوحدة الصغيرة تتكون من **16s** وحوالي ٢٠ وحدة ببتيدية . وذلك لان حجمها **70s** .

ويتمثل الـ **rRNA** بشكل سلسلة مفردة منطوية بشكل غير منتظم . والرايبوسومات في الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء تماثل رايبوسومات خلايا بدائية النواة .

أما الرايبوسومات في خلايا حقيقية النواة فتتكون من وحدات **40s & 60s** لان حجمها يبلغ **80s** فالجسيمة **60s** تتكون من **5s & 28s** واكثر من **'50** جزئية من متعدد الببيستايد . بينما الـ **40s** يحتوي على **18s** من الـ **rRNA** واكثر من **'30** وحدة متعدد البيتايد في الوحدة الصغيرة . وفي حقيقية النواة **(Eucaryot)** يحتوي كل رايبوسوم على موقعين لارتباط الـ **tRNA** عليها وهما :

A-site وهو موقع الـ**aminoacyl - tRNA** الذي يحمل الحامض الاميني **p-site** او **peptidyl site** الذي يرتبط الـ **tRNA** على عديد الببتيدات النامية .

الفصل الرابع

التركيب الكيميائي والجزيئي للكروموسومات

التركيب الكروموسومي لحقيقة النواة
Eukaryote chromosome

الدورة الخلوية The cell - cycle

أ - في حقيقية النواة Eukaryotic

تنقسم الدورة الخلوية في حقيقية النواة الى ثلاثة مراحل هي :

١- المرحلة البينية Interphase

٢- مرحلة الانقسام الخيطي (انقسام النواة) Mitosis

٣- مرحلة انقسام الخلية Cell Division

فالمرحلة البينية تتميز بتعاقب العديد من الحوادث حيث تحصل فيها زيادة حجم الخلية والكتلة الجافة .

وتتوقف الفترة الزمنية لاكمالها على العديد من العوامل منها العوامل الغذائية ، ودرجات الحرارة ونوع النسيج وغيرها من العوامل وتتراوح الفترة الزمنية لأتمامها بين ٣ ساعات الى ١٧٤ ساعة حسب نوع الكائن الحي .

وقد وجد في انواع من الانسجة البشرية ان الفترة الزمنية اللازمة تتراوح بين ١٨ - ٢٤ ساعة وتتضمن المرحلة البينية على :

١- المرحلة البينية الاولى (مرحلة النمو الاولى) Gap - 1 وفيها تتم عملية تخليق الحامض النووي الرايبوزي RNA والبروتين وبشكل خاص :

أ - الانزيمات الخاصة بعملية تضاعف الـ DNA في المرحلة اللاحقة .

ب - البروتينات التي تعمل على الانقسام النووي .

جـ - بروتينات جهاز الانقسام الخيطي والنبيبات الدقيقة .

وقد تكـون قصيرة خاصة فـي الخلايا الجينـية للثديـيات والاشكال الواطئـه مثل الفطريات المخاطية والخمائر . من ناحية أخرى فانها تكون طويلة حوالي ١٥٠ ساعة في جذور الذرة الناضجة .

أما فـي الخلايا المتـميزة والـتي لا تنقـسم مثـل الخلايا الـعصبيـة فيطـلق عليـها بالمرحلة الصفرية **(G0)** .

٢- مرحلة البناء للـ **DNA** **(DNA-Duplication)**

وفيهـا تحدث عمـلية تضاعـف للحامـض النووي **DNA** والبروتينات النووية (الهستونات) وفي نهايتها ينقسم كـل كروموسوم ألى كروماتيدين وتدوم الفترة هذه حوالي ٣٥-٤٥٪ من المرحلة الـبينية وفي مزارع الخلايا البشريـة تستغرق بين ٦ - ٨ ساعات.

٣- المرحلة البينية الثانية (مرحلة النمو الثانية) **Gap-2**

وفيها تستمر عمليات بناء الـبروتين والحامض النووي الرايبوزي (وبشكل أقل مـن المـرحـلة الأولـى) كـمـا أن ال **DNA** الجديـد يتحـد مع البروتـينات الخـاصة بالكروموسومات . وتشغل حوالي ١٠-٢٠٪ من المرحلة البينية.

وبعد اكتـمال الفترة الفـاصلة الثانيـة تدخل الخلية فـي مرحلة الانقســام النووي **Mitosis** والـتي تضم اربعـة اطوار هي الطـور التمهـيدي **prophase** وطور تكوين المغزل **Metaphase** .

والطور الانفـصالي **Anaphase** والطور الـنهائي **Telophase** و التي بعـدها تدخـل الخليـة في مرحلـة الانقسـام السايـتوبلازم الخـلوي **cytokinesis** (الشكل ٥-١).

ب- في بدائية النواة **prokaryotic**

تعـتمد الـدورة الخلوية فـي بدائيـة النواة عـلى الظـروف الغذائيـة ، ففي حـالة

الظروف الغذائية المثلى **optimal** فان تضاعف الـ **DNA** يشغل كامل الفترة بين الانقسامين ولكن في حالة الظروف تحت المثلى **suboptimal** فان مرحلة تخليق الـ **DNA** تشغل فترة مساوية للفترة تحت الظروف المثلى الا أن عملية النمو تستمر الى ان يتضاعف حجم الخلايا عند ذلك تنقسم الخلايا . ان جزئيات الـ **DNA** المتضاعفة تنفصل من دون تكوين المغزل.

الكروماتين chromatine

يتألف الكروماتين من حلزون مزدوج طويل من الـ **DNA** بالاضافة إلى البروتينات القاعدية التي تدعى بالهستونات والحامضية التي تسمى باللاهستونات.

يوجد نوعان من الكروماتين هما :-

أ- الكروماتين الحقيقي **Euchromatine** ويكون على شكل خيوط رفيعة غير ملتفة ويكون فاتح اللون عند صبغه وهو الجزء الفعال من الناحية الوراثية . لا يحتوي على البروتينات الحامضية (**nonhistones**).

ب- الكروماتين المغاير **Heterochromatine** ويكون كثير الطيات ويصطبغ بشدة بالصبغات القاعدية وهو غير فعال من الناحية الوراثية . ويمكن رؤيته بسهولة تحت المجهر الضوئي ويوجد في منطقة السنترومير والقطع الطرفية من الكروموسومات وفي منطقة تنظيم النوية. ومن المعروف ان الكروماتين المغاير لا يستنسخ في المرحلة البينية كما هي الحال للكروماتين الحقيقي في الـ **RNA** (ويحتوي كيميائيا على البروتينات الاهستونية). وهناك نوع من الكروماتين المغاير هو الاختياري **facultative** الذي يوجد في كروموسومات الانثوية **(X)** البشرية.

كما أن المناطق متغايرة الكروماتين تحتوي على مناطق غير جينية من الحامض النووي **DNA** وهذه تتضمن **Repetitive-DNA** أو**(satellite-DNA)**

ويعتقد انها تقوم بالوظائف التالية :

١- لها دور في تنظيم تركيب الكروموسومات.

٢- لازمة في تزاوج الكروموسوم خلال عملية الانقسام الاختزالي .

٣- ضرورية في عملية العبور **crossing over** وتبادل الاجزاء **Recombination** .

٤- حماية الجينات التركيبية مثل الهستونات **r-RNA** وجينات البروتين الرايبوسومية .

التركيب الكروموسومي في حقيقية النواة
Euchromosome structure

تتركز معظم مادة الـ **DNA** في حقيقية النواة في الكروموسومات المتواجدة داخل النواة وقد بينت الدراسات على الانوية المعزولة ان المادة الرئيسية المكونة لها هي الكروماتين وهو المادة الرئيسية للكروموسومات ومنها جاء الاسم.

كما توجد مادة الـ **DNA** في جسيمات الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء (في الخلايا النباتية) وهو يشبه كروموسومات بدائية النواة (مثل البكتيريا) حيث يتألف من حلزون مزدوج للـ **DNA** ويكون خالي من البروتينات ويكون مسؤول عن بعض الفعاليات الحيوية لهذه العضيات .

والكروموسومات عبارة عن اجسام خيطية دقيقة تظهر خلال الانقسام الميتوزي (الخيطي) بعد تلوينها كما تظهر تحت المجهر متباين الاطوار **phase-contrast microscope** داخل الخلايا الحية .

المكونات الكيميائية للكروموسوم

Chemical composition of chromosome

لقد تمكن من استخدام الطرق البايوكيميائية والبايوفيزيائية والمجهر الالكتروني من عزل الكروموسومات ومعرفة تركيبها الكيميائي .

تتركب الكروموسومات من الحامض النووي **DNA** والبروتينات الهستونية بشكل رئيسي ودائم بالاضافة الى بروتينات حامضية لا هستونية وقليل من الحامض الرايبوزي **RNA** .

تقسم البروتينات الكروموسومية الى نوعين هما :-

أ- البروتينات القاعدية والتي تسمى بالهستونات **Histones** وهي ذات شحنة موجبة عند نقطة التعادل للـ **PH** وتشكل مع الـ **DNA** السمة الاساسية لكروموسومات حقيقية النواة.

ب- البروتينات الحامضية غير الهستونية **Non-Histones** وهي ذات شحنة سالبة عند نقطة التعادل للـ **PH** وهي جزئيات عديدة وغير متجانسة شديدة الارتباط مع الدنا- هستون وهي بروتينات غير ثابته بعكس الهستونات .

وتقسم الهستونات إلى خمس انواع رئيسية بالاعتماد على محتواها من االاحماض الامينية اللايسين أو الارجنين.

١- الغنية باللايسين H_1

٢- ذات درجة متوسطة من اللايسين $H_2 a$,$H_2 b$

٣- الغنية بالأرجنين H_3, H_2

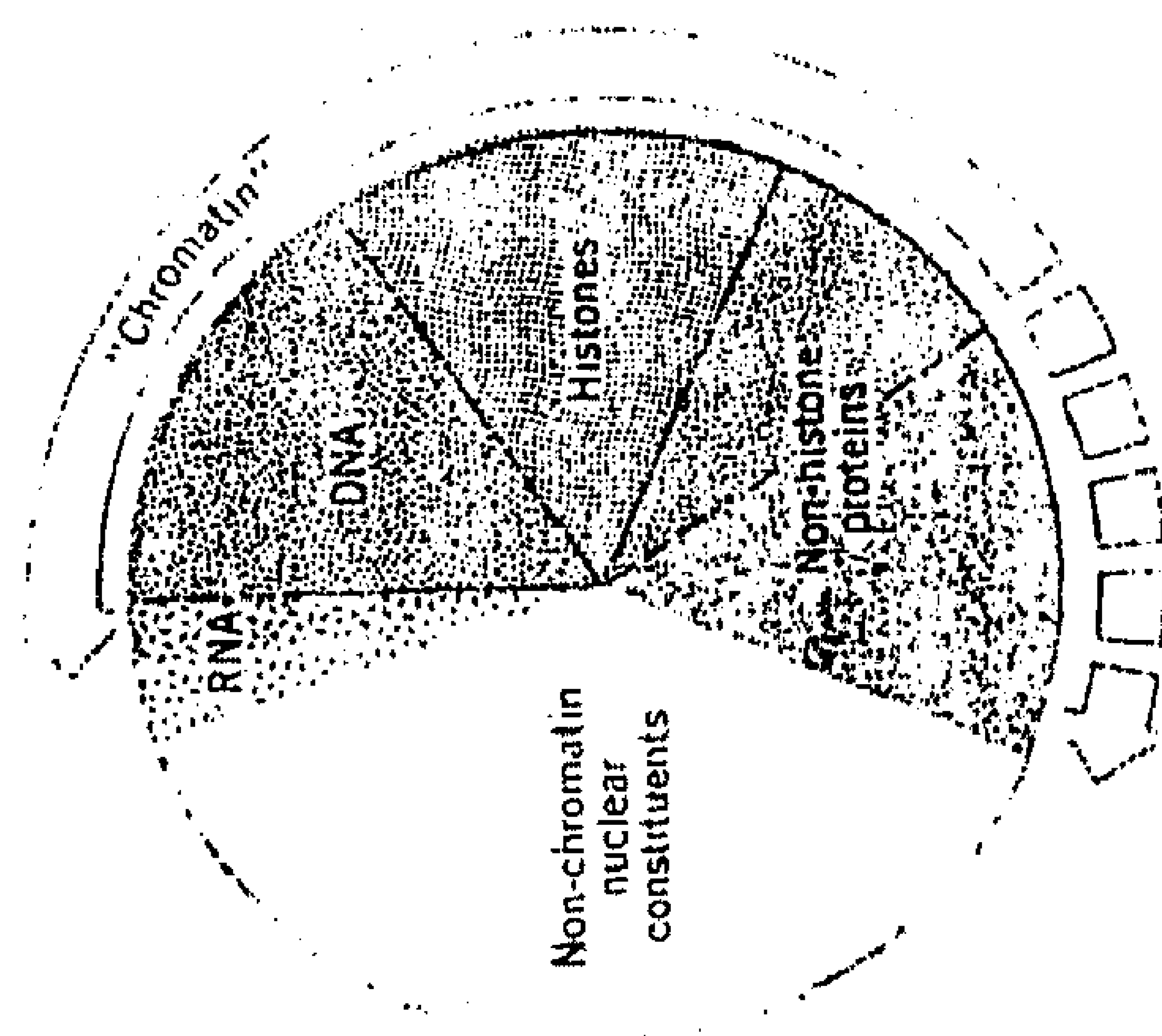
وتختلف في الوزن الجزيئي حيث يبلغ حوالي ٢١٠٠٠ للا H_1 بينما يبلغ ١١,٠٠٠ الـ H_4 كما انها تكون خالية من الحامض الأميني العطري التربتوفان الذي يوجد في البروتينات اللاهستونية.

وتشكل الهستونات حوالي ٥٤٪ من بروتينات النواة في خلية الكبد . ان تضاعف الهستونات يصاحب عملية تضاعف الـ **DNA** فقط بينما يكون بناء البروتينات اللاهستونية مستمراً . يعتبر بعض الباحثين ان الهستونات ثابتة ومقاومة للتلف الحراري **heat - damage** وللانزيمات **nucleases** .

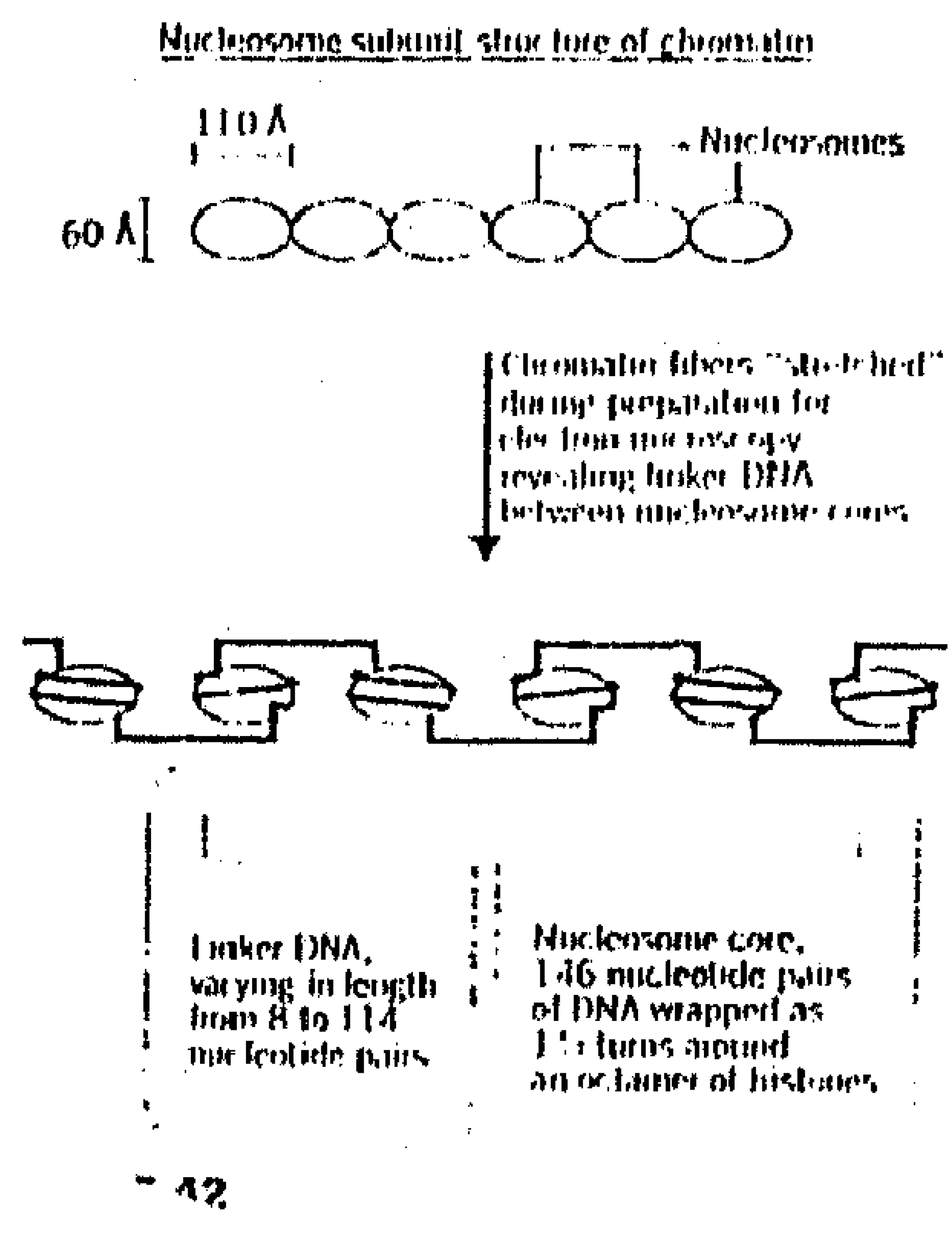
تلعب الهستونات دوراً هاماً في تركيب الكروموسومات وتؤدي بعض الفعاليات في التعبير الجيني **Gene expression** ، وبما انها تحتوي على شحنة موجبة فانها تكون معقدة مع المجموعة السالبة للفوسفات في الـ **DNA** كما ان وجودها يزيد من قطر الـ **DNA** من $20A^o$ إلى $35A^o$ كما تزيد من لف الـ **DNA** الذي يعمل على تثبيط الاستنساخ.

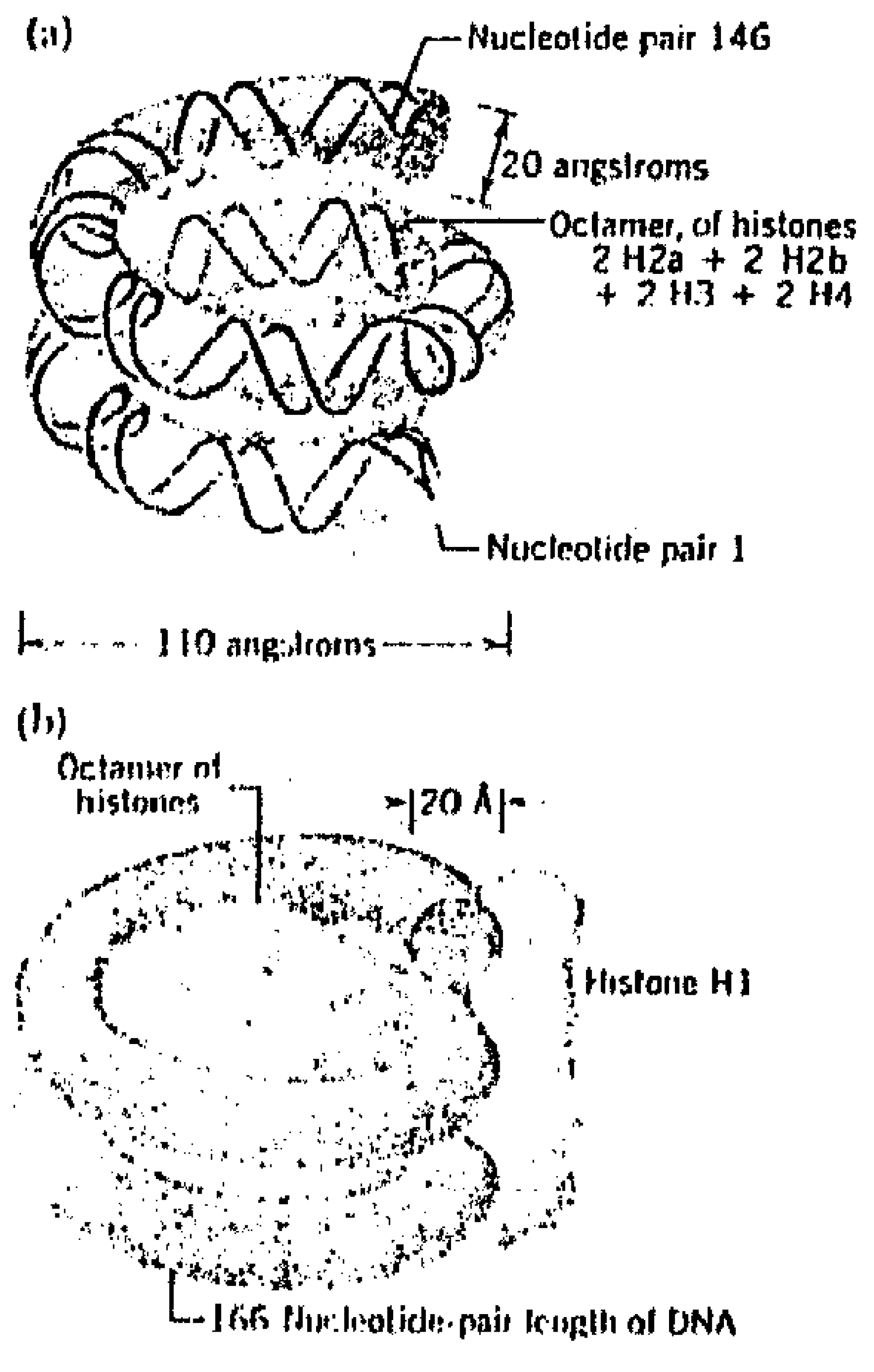
اما البروتينات غير الهستونية (الحامضية) فانها تلعب دوراً مهما في تنظيم عمل الجينات في التنشيط والتثبيط. فهي تتضمن انزيمات التضاعف والنسخ حيث تسمح بعملية الاستنساخ مع الـ **DNA** فالوحدة الثانوية سيكما (σ) للـ **m-RNA** المسؤولة عن تحفيز عملية الاستنساخ هي عبارة عن بروتين هستوني-مفسفر .

والهستونات تكون كهربائيا **poly cations** وهذا هام لتفاعلها مع الدنا **DNA** الذي يكون كهربائيا **poly anions** ويعود ذلك الى الشحنه السالبه لمجموعات الفوسفات.

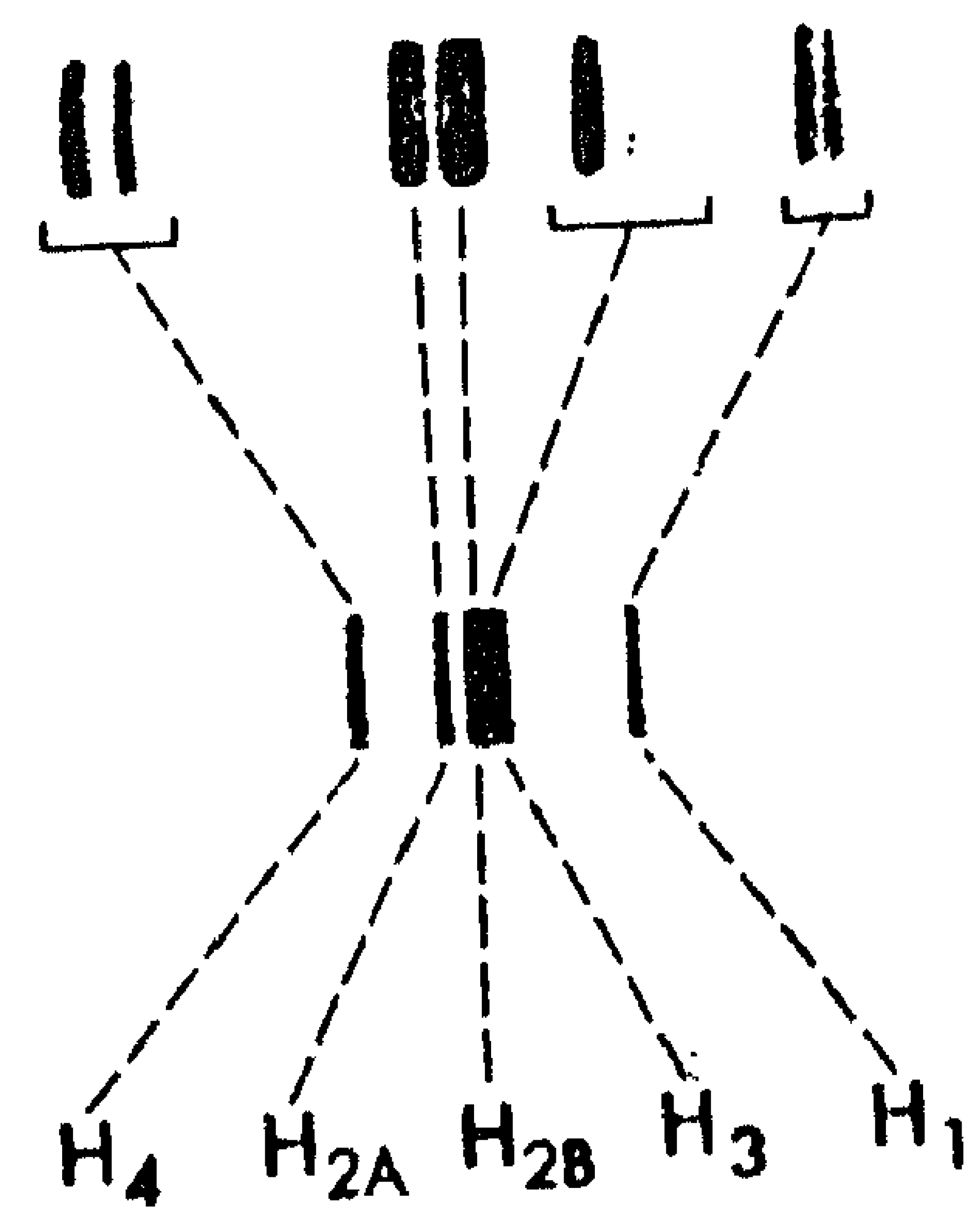


شكل (٤-١) التركيب الجزيئي للكروماتين





شكل (٤-٢) أنواع الهستونات



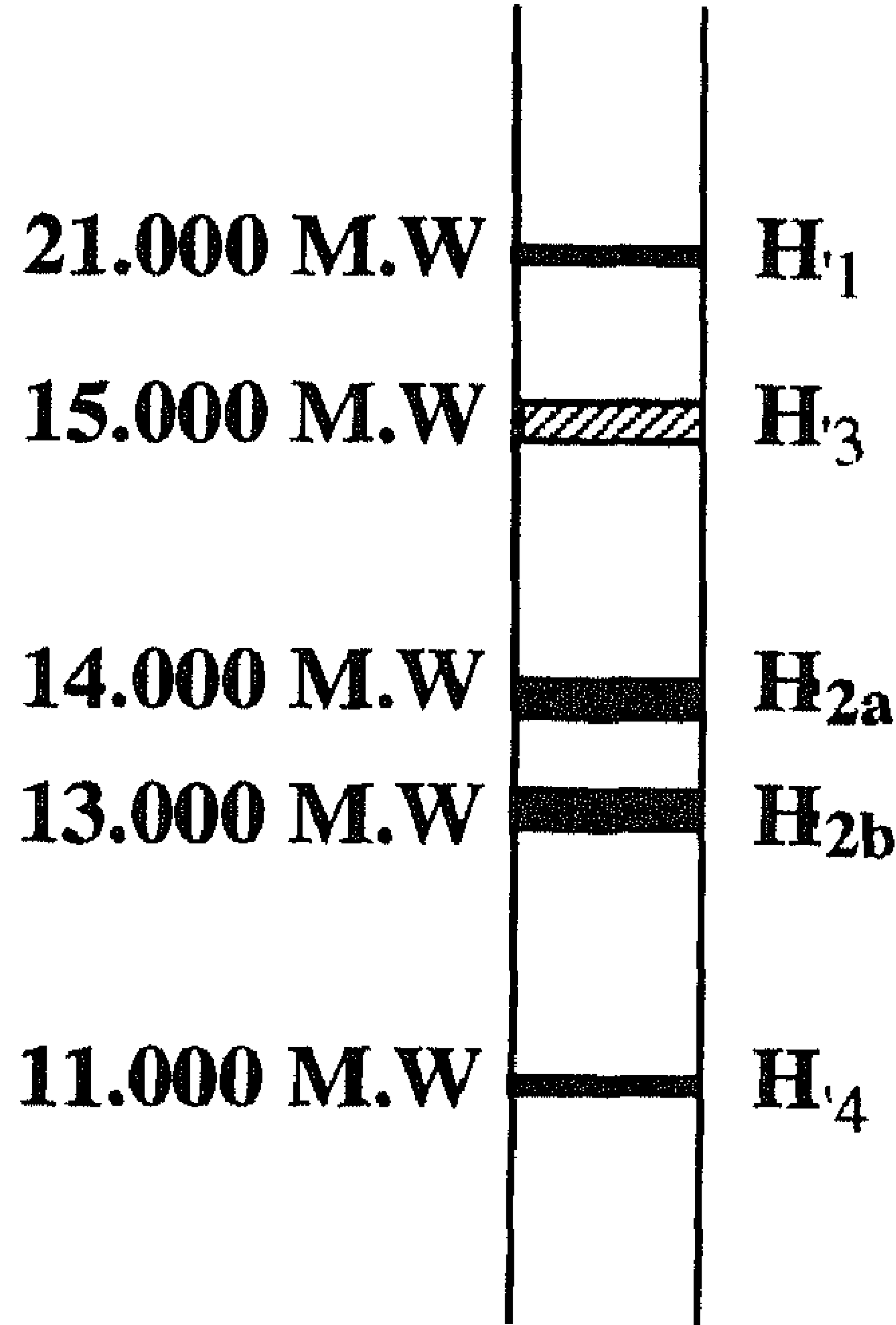
شكل (٤-٣) يوضح التركيب الجزيئي للجسيمات النووية

الخواص الكيميائية للهستونات :-

١- تحتوي الهستونات على ٢٠-٣٠٪ احماض أمينية قاعدية من الارجنين واللايسين وهي تحتوي على شحنة موجبة (NH_3^+) تتفاعل مع الشحنة السالبة لمجموعة الفوسفات (po_4) في جزئي الـ **DNA** .

٢- ان المجموعات الخمسة من الهستونات توجد بنسب مولارية **molar** ثابته فهي تقريبا **H_1, H_2a b, H_3, H_4** .

٣- يمكن فصل وتنقية هذه البروتينات بواسطة تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام **polyacrylamid gel** كما في الشكل المرفق .



شكل (٤-٤) يبين أنواع الهستونات وأوزانها الجزيئية

(تقنية الهجرة الكهربائية)

الجسيمات النووية Nucleosomes

وتتكون من البروتينات القاعدية (الهستونات) مع الحامض النووي DNA وهي المكونات الاساسية للكروموسومات.

فقد وجد انه عند استخلاص الكروماتين من الانوية يظهر التركيب الاساسي الذي يبدو عبارة عن شكل يشبه حبات المسبحة **Beaded form** والتي يطلق عليها اسم الجسيمات النووية **nucleosomes.** ويبلغ طول الحبة الواحدة حوالي ١١٠ أنكستروم وارتفاعها ٦٠ أنكستروم وشكلها اهلليجي وترتبط مع بعضها بواسطة خيوط دقيقة تسمى بالـ **linker-DNA** أومابين الجسيمات النووية والتي يبلغ طولها من ٥٠-٣٤٠ انكستروم والذي يعتمد على نوع الخلايا. ويعتقد كورنبرك (١٩٧٧) ان الهستون H_1 يرتبط مع **linker-DNA** من الخارج ويبلغ قطر المعقد هذا ٣٠-٣٥ A^o .

وقد وجد ان لب الجسيم النووي **nucleosome core** يتكون من تركيب ثماني **octamer** مؤلف من جزيئين كل منهما مكون من اربع هستونات $2X(H_4, H_3, H_2b, H_2O)$. اما سطح اللب فيحاط بواسطة شريط حلزوني فائق اللف من ال **DNA** بمقدار لفة واحدة وثلاثة ارباع اللفة ('1.75 لفة) من ٨٠ نيكليوتيدة لكل منها بمعنى ان عدد النيكلوتيدات الملفوفة يبلغ ١٤٠ زوج حيث يتكون معقد مقاوم للانزيم **nuclease** أما الخيوط الرابطة **linker** فهي قطع حساسة لمهاجمة الانزيم **nuclease** .

أما في التركيب الكامل فانه يتكون من حوالي ٢٠٠ نيكليوتيدة من DNA وحوالي تسع هستونات (كما الشكل ٥-) والذي يلاحظ فيه تثبيث اللف الكامل للا **DNA** بواسطة الهستون H_1 المحيط بالتركيب الثماني .

تتكون الوحدة الثانوية الكاملة من الكروماتين ممايلي :

١- لب الجسيم النووي ٢-الخيط الرابط DNA ٣- على الاقل جزئي واحد من الهستون H_1 ٤- بالاضافة الى بروتينات لاهستونية .

التركيب الكروموسومي في بدائية النواة
Prokaryote Chromosomes Structure

يختلف التركيب الكروموسومي لبدائية النواة عما لاحظناه في حقيقية النواة فكروموسوم البكتيريا المعوية **E.coli** يتكون من شريط مزدوج من جزئيات الـ **DNA** دائري الشكل يبلغ طوله حوالي ١١٠٠ ميكرون بينما تبلغ طول الخلية البكتيرية ١-٢ ميكرون فقط لذلك يتوجب على الكروموسوم ان يكون منطويا او ملتفا داخل الخلية ويطلق على هذا التركيب بالـ **folded genome** في حالة الكروموسوم الوظيفي ان جزئية الـ **DNA** المفردة في البكتيريا المعوية مرتب من عرى **loops** أو مقاطعات **domains** وكل واحدة منها ملتفة لفا فائقا **supercoiled** (مثل حبل التلفون الملتف) وهذا التركيب يعتمد على كلا من الـ **RNA** والبروتين وكلاهما من مكونات الكروموسوم المنطوي **folded genome** (الشكل ٥-) .

ان اللف الفائق هو سمة هامة لجميع الكرموسومات في كل الكائنات من الفايروسات حتى حقيقية النواة.

ويكون اللف على نوعين اما :-

أ- لف فائق سالب **negetive supercoil**

ب-لف فائق موجب **positive supercoil**

ان العديد من الوظائف البايولوجية للكروموسومات يمكن ان تتم فقط عنده

تكون جزئيات الـ **DNA** ذات لف سالب وهـذا ما وجد في جميع كـروموسومات البكتيريا حيث انه لازم لعمليات تبادل الاجزاء الـ **Recombination DNA** والتعبيـر الجيني **gene expression** وتنظـيمه كما انـه لازم لاغلب عمـليات تضاعف الـ **DNA** والانزيم الذي يحفز عـلى تشكيل اللف الفائق الـسالب يسمى بالـ **DNA-gyrase** ويثبط نشاطه بواسطة بعض العقاقير **Drugs** مثل **nov-obiocin** وحامض الـ **nalidixic acid**.

الفصل الخامس

تضاعف واستنساخ الاحماض النووية

تضاعف الـ DNA

لغرض فـهم عمليـة تضاعف الدنـا من الضروري التـعرف على خمـس سمات هامة في هذه العملية :

١- ان تزاوج القواعــد النيتروجيـنية يكـون دائماً بـشكل متمم **complementary** .

٢- الشريطان في الـ **DNA** يكونان دائماً بشكل متوازيان ومتعاكسان **antiparallel**.

٣- تحتاج عملية التضاعف للدنا دائماً على المرصاف **Template** لبناء الشريط الجديد عليه .

٤- من الضروري تكوين البادىء **primer** .

٥- تتم جميع التفاعلات تحت سيطرة انزيمية وهي انزيمات البلمرة **polymerases** .

تضاعف واستنساخ الاحماض النووية

Replication and Transcription of Nucleic Acids

تضاعف الدنا :- DNA-Replication

يتم تضاعف الـ DNA للفايروسات داخل جسم الخلية المضيفة ويتم تضاعف الـ DNA في بدائية النواة داخل المنطقة النووية أما في حقيقية النواة فيتم داخل النواة .

يتضاعف الدنا تضاعفا ذاتيا لنقل المعلومات الوراثية من الاباء الى الابناء وعلى ذلك يجب ان تكون العملية كاملة ودقيقة للمحافظة على الثبات الوراثي.

وتتم عملية التضاعف في مرحلة بناء الـ DNA من الدورة الخلوية، DNA-synthesis .

تضاعف الـ DNA في بدائية النواة :-

لقد اظهرت الدراسات التي تمت على البكتيريا المعوية E. coli في الدراسات الزجاجية in vitor أن عملية التضاعف تتطلب مايلي:-

١- وجود وحدات بنائية بادئه .

٢- وجود ايون المغنيسيوم الفعال ++Mg .

٣- وجود انزيمات تضاعف الدنا (DNA-polymerases).

٤- وجود المرصاف (القالب) template .

وفيما يلي الخطوات التي تتم فيها عملية التضاعف في البكتيريا المعوية:-

١- بدء التضاعف : تتطلب عملية التضاعف بدء فتح unwinding للحلزون المزدوج لتكوين شريطين كل منهما يعمل كمرصاف Template ويتم ذلك بواسطة انزيم يسمى بالـ Endonuclease.

الذي يقوم بقطع السلسلة في مناطق السكر-فوسفات المكون للعمود الفقري الـ DNA وفي مناطق محددة منها.

ثم يحدث بعد ذلك تكسير الروابط الهيدروجينية الضعيفة التي تربط البيورينات مع البريميدينات. ونتيجة لذلك يتكون ما يسمى بفقاعات التضاعف **replication bubble** والتي منها يتكون شكل الشوكة **replication-fork** ويكون على شكل حرف **(Y)** كما في الشكل (٦-١)

٢- فتح مرصاف الـ**unwinding of template-DNA** ينفتح الشريط في نقطة بداية التضاعف على طوله ويتم ذلك بمساعدة ثلاثة انواع من البروتينات وهي :-

أ- بروتينات مرتبطة مع الشريط المفرد للدنا التي تساعد على عملية الفتح وثبوت المرصاف لعملية البناء .

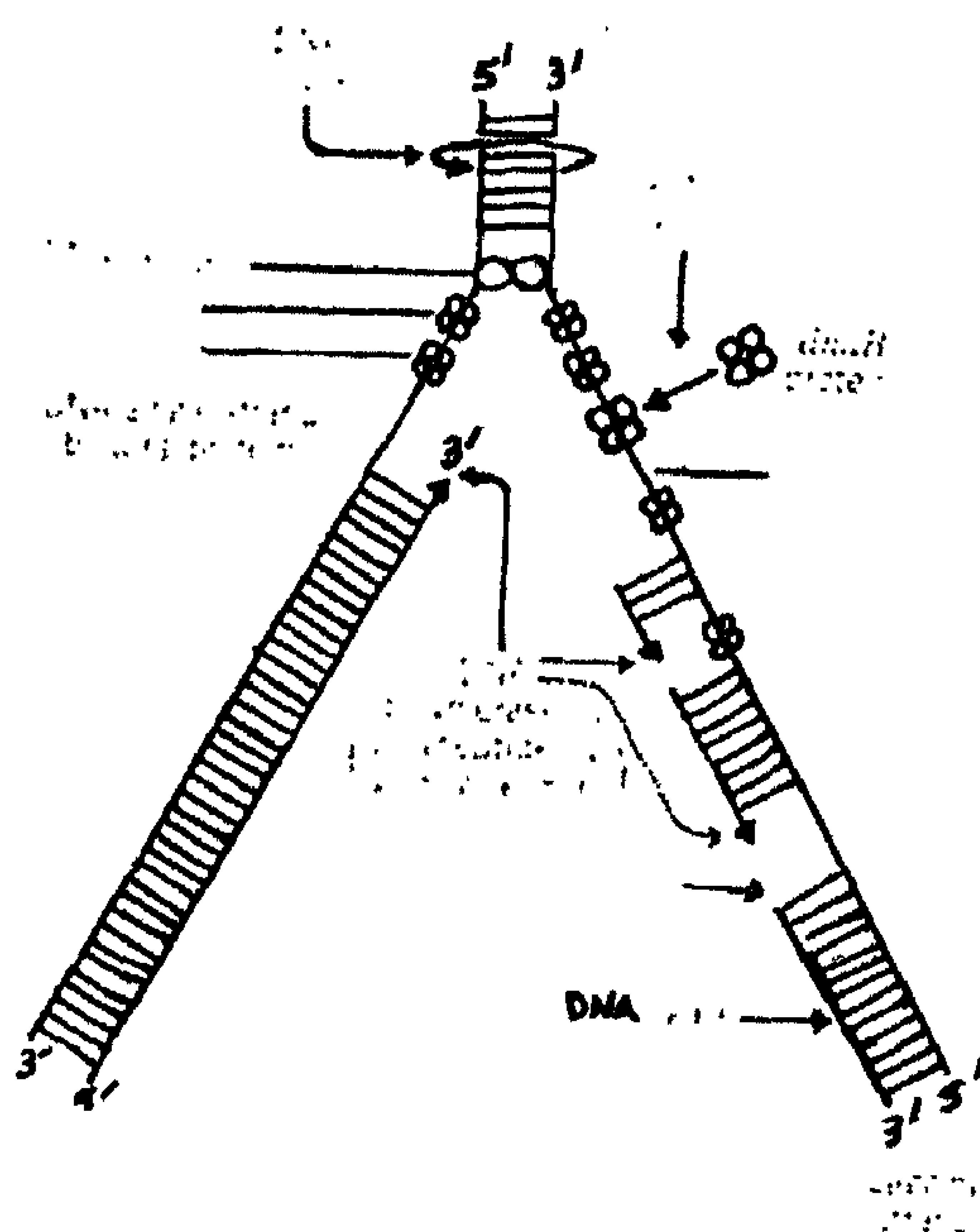
ب- بروتينات فتح الدنا او ما يسمى بالـ **(DNA-helicase)** وهي لازمة لغرض الشريط الحلزوني المزدوج .

جـ- انزيم **DNA-gyrase** الذي يحفز تكون اللف الفائق السالب في الدنا.

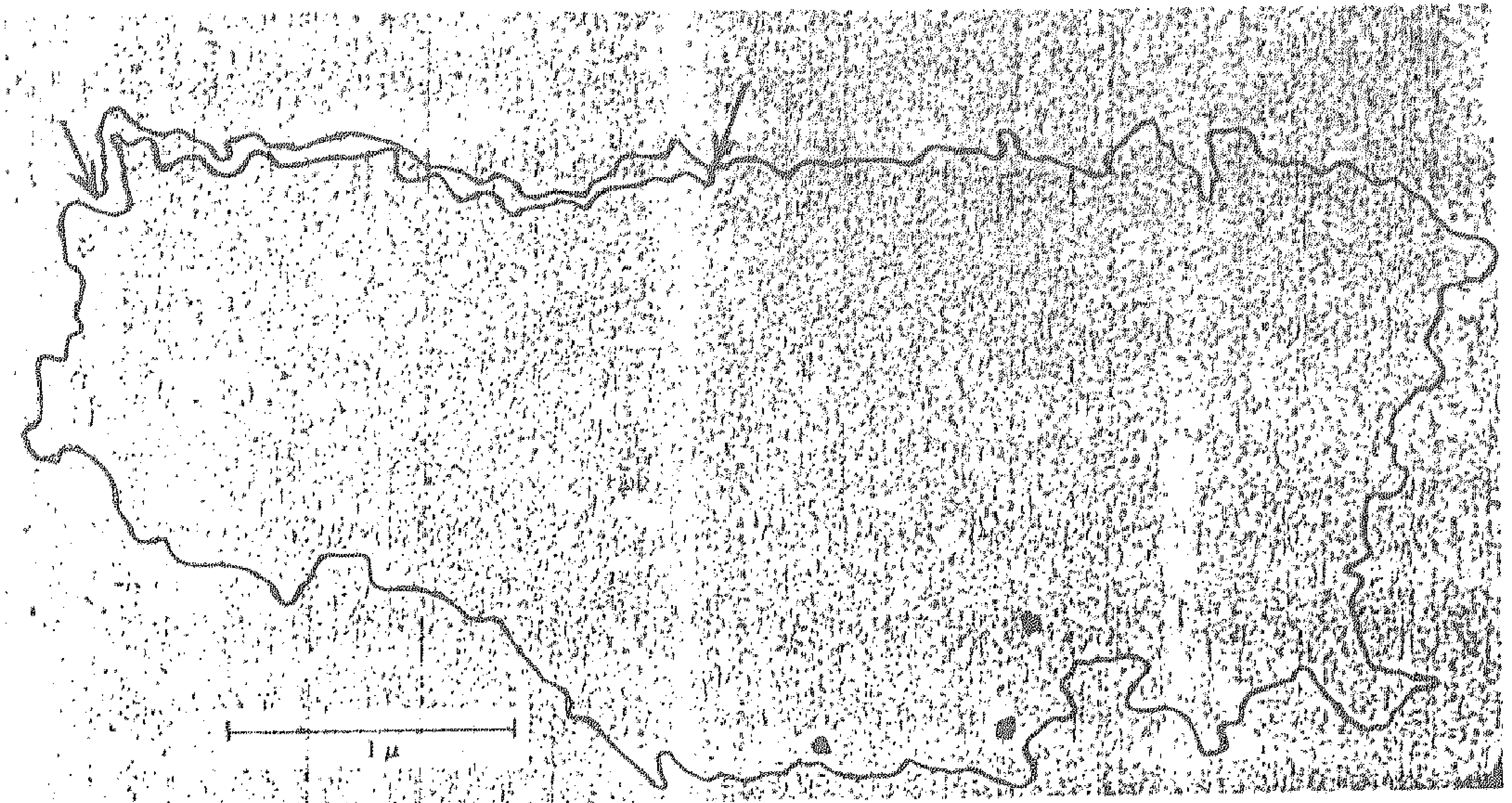
٣- البادىء : **Priming**

الانزيمات المسؤولة لاضافة اشرطة جديدة متممة إلى المرصاف يمكن ان تعمل فقط عند وجود بادئ من النيكليوتيدات وهذا يتم بتخليق قطعة صغيرة من ال **RNA** البادىء **(primer-RNA)** من خلال عمل انزيمي يسمى بالـ **primases** له خصائص تميزه عن الانزيمات **RNA -polymerases** ويبلغ طول البادىء في بدائية النواة من ١٠-٦٠ نيكليوتيدة. بينما يكون طوله في حقيقية النواة فقط ١٠ نيكلوتيدة.

ونتيجة فعل انزيم **primase** تتكون مجموعة هيدروكسيل **(OH)** حرة على النهاية ('3) في الـ **RNA** عليها تضاف نيكليوتيدات الدنا . ومن ثم يتم ازالة الرنا البادىء كليا انـزيمياً والذي يتـرك فجوة **Gap** في نيكليوتـيدات الدنا الجديدة والتي يستوجب ملؤها .



شكل (٥-١) يبين خطوات تضاعف الـ **DNA** في البكتيريا



شكل (٥-٢) صورة بالمجهر الالكتروني تبين تضاعف الـ DNA في البكتريوفاج

(نصف المحافظ)

الاسهم تشير الى المضاعفات Replicon

٤- انزيمات البلمرة **The DNA -polymerases**

يوجد في البكتيريا المعوية ثلاثة انواع من انزيمات التضاعف (البلمرة) وهي **III,II,I** يعمل كلا منها على تحفيز تضاعف الدنا بتوجيه نيكليوتيدات الدنا ثلاثية الفوسفات توجيهاً مباشراً نحو دنا المرصاف ويتم التضاعف لكلا الشريطين بالاتجاه (3َ <--- 5َ) .

الانزيم المبلمر **I** يتكون من حوالي ٤٠٠ جزئية وله وزن جزيئي ١٠٩,٠٠٠ يرتبط مع الشريط المفرد الـ**DNA** وهو المسؤول عن ملىء الفجوة في البادىء كما انه يستخدم في توازن سلاسل النيكليوتيدات الجديدة واستئصال النيكليوتيدات المرتبطة ارتباطا خاطئاً بالاتجاه (5َ<--- 3َ) وهو ضروري ولا يمكن الاستغناء عنه في عملية تضاعف الـ **DNA** .

الانزيم المبلمر الثاني **II** ويتكون من سلسلة مفردة بوليبتيدية تتكون من ٩٠,٠٠٠- ١٢٠,٠٠٠وزن جزيء له نفس القدرة على عملية البلمرة كاللانزيم **(I)** كما ان له نشاط **Exonuclease** بالاتجاه (5َ<--- 3َ) ولكن يفقد هذه القدرة بالاتجاه (3َ<--- 5َ) .

الانزيم المبلمر الثالث **III** وزنه الجزيئي ١٤٠,٠٠٠و٤٠,٠٠٠ حيث يتكون من سلسلتين ببتيديتين وعشرة جزئيات تحصل في كل خلية من خلايا البكتيريا المعوية.

ويتميز عن الانزيمين الاول والثاني بمايلي:-

أ- عدم استخدامه في الشريط المفرد للدنا .

ب- ليس له نشاط انزيم **Exonuclease** بالاتجاه(3َ<--- 5َ) .

جـ- عدم ثبوته.

د- ميله الضعيف نحو نيكليوزيدات ثلاثي الفوسفات .

يعمل هذا الانزيم على غلق الفجوات من ١٠-٥٠ نيكليوتيدة على الشريط المزدوج للدنا كما انه يعمل بالاتجاه (5َ<--- 3َ) .

٥- قطع اوكازاكي **Okazaki fragments** .

لقد اشارت بعض الافكار الى أن احد الاشرطة تمتد بشكل مستمر بينما الأخر يتوقف استمراره. الا انه في الوقت الحاضر يتفق علماء الوراثة الجزيئية على على أن كلا الشريطين الوليدين (الجديدين) امتدادهما غير مستمر على المرصافين الدليل الرئيسي على التخليق غير المستمر **discontinuous synthesis** جاء من قبل العالم اوكازاكي ومساعديه. الذي لاحظ ان الاشرطة الوليدة في البكتيريا المعوية تضاف بشكل قطع مكونة من ١٠٠٠ -٢٠٠٠ نيكليوتيدة وبشكل غير متصل مع بعضها البعض على كلا الاتجاهين في منطقة التضاعف وقد اطلق على هذه القطع اسم قطع أوكازاكي. ترتبط هذه القطع مع بعضها البعض لانتاج شريط جديد متصل بواسطة انزيم يسمى **DNA-ligase** .

ويلاحظ ان قطع اوكازاكي نفسها تتألف من ارتباط قطع ثانوية صغيرة والتي تحمل قطع صغيرة من نيكليوتيدات الـ **RNA** على النهاية (5َ) وتزال هذه القطع كما ذكرنا سابقا عندما ترتبط القطع الثانوية مع بعضها لانتاج قطع طويلة هي قطع اوكازاكي .

تضاعف الدنا في حقيقية النواة
Replication of Eukaryotic DNA

ان عملية تضاعف الكروموسومات في حقيقية النواة لا يتطلب فقط تضاعف الدنا وانما تضاعف للبروتينات المرافقه له مثل الهستونات واللاهستونات .

ومن الناحية الجزيئية فان تضاعف الدنا في حقيقية النواة يبدو انه يتطلب عدداً

من الانزيمات المشابهة لما لاحظناه في تضاعف الدنا لبدائية النواة وبنفس الآلية .

فإنزيمات البلمرة لها نفس الفعاليات على كلا من تكوين المرصاف **template** (القالب) البادئ **primer** الذي شرحناه في بدائية النواة .

وقد اثبتت الدراسات ان الحامض النووي **DNA** يتضاعف بطريقة الاحتفاظ النصفي **Semi conservative replaction** .

أي أن كل شريط مفرد في الشريط المزدوج يعمل كقالب (مرصاف) **template** لتكوين شريط آخر جديد (متمم) ومن النوع غير المستمر **Discontinuous** بالاضافة الى ذلك فان قطع اوكازاكي تنتج بعملية التخليق غير المستمر ويتراوح عدد النيكليوتيدات بين ١٠٠ - ٢٠٠ وحدة فقط وهذا يعني ان عملية تضاعف الدنا في حقيقية النواة أبطئ منه (حوالي ميكرون واحد في الدقيقة) في بدائية النواة (حوالي ٣٠ ميكرون بالدقيقة) .

انزيمات البلمرة :

توجد ثلاثة انواع من انزيمات البلمرة في حقيقية النواة وهي مماثلة لانزيمات البلمرة في بدائية النواة ويطلق عليها هنا بالفا α وبيتا β وكاما γ بالاضافة الى ذلك فقد عزل انزيم مبلمر رابع من الغدة التايموسية **Thymus** للعجول ونخاع العظم في الارانب يطلق علية اسم سكما (σ) **sigma** .

فالانزيم α هو المسؤول عن تضاعف الدنا الكروموسومي

وتقع الانزيمات α و β في النواة اما الانزيم γ فيقع في الميتوكوندريا وفي البلاستيدات الخضراء في الخلايا النباتية ومن المحتمل ان هذا الانزيم هو المسؤول عن تضاعف كروموسومات هذه العضيات .

المتضاعفات : The Replicon

لقد اثبتت الدراسات باستخدام تقنية التصوير الشعاعي الذاتي **autoradi-raphyog** باستخدام نظير الهيدروجين المطعم بالثايين (^{3}**H-Thymidine**) ان **DNA** كروموسومات حقيقية النواة يتضاعف بواسطة تكوين عدد من فقاعات التضاعف **replication bubbles** وباتجاهين ويطلق على قطع التضاعف هذه اسم المتضاعفات **Replicons** او وحدات التضاعف **Replication unit**.

وكل كروموسوم يحتوي على سلسلة من المتضاعفات كلا منها يسيطر عليه بواسطة قطع مسيرة للعمل المشابهة **operator - like segment** يطلق عليها اسم منطقة التضاعف **Replicator** (في البكتيريا المعوية **E.coli** يوجد **Replicon** واحد فقط) .

التضاعف نصف المحافظ للـ DNA
Semiconservative Replication of DNA

لقد ادى اكتشاف واطسن وكريك التركيب الحلزوني المزدوج للـ **DNA** الى تفسير الكيفية التي يتضاعف فيها شريطا الحلزون .

فقد اظهرت تجارب ميزلسون **Meselson** وشتال **Stahl** عام ١٩٥٨ طبيعة الاحتفاظ النصفي لعملية تضاعف الدنا في البكتريا المعوية باستخدام تقنية الطرد المركزي متوازن الكثافة .

كما اثبتت تجارب كيرنس **Cairns** عام ١٩٦٣ باستخدام طريقة التصوير الشعاعي الذاتي الى ان تضاعف كروموسوم البكتريا المعوية يكون بطريقة الاحتفاظ النصفي. (حيث استخدم نظير الهيدرجين المطعم بالثايميدين (^{3}**H - thymidine**).

اما بالنسبة لكروموسومات حقيقية النواة فقد اوضح تايلور **Tylor** وجماعته عام ١٩٥٧ طبيعة الاحتفاظ النصفي في تضاعفها عندما اجروا تجاربهم على خلايا القمة النامية لجذور الباقلاء ، وذلك باستخدام تقنية التصوير الشعاعي الذاتي أذ تمت تنمية الجذور في وسط يحتوي على نظير الهيدرجين المطعم بالثايميدين (^{3}**H - thymidine**) .

وفي تجربة ميزلسون وشتال نميت البكتريا المعوية **E. coli** في وسط غذائي يحتوي على النيتروجين الثقيلN^{15} بدلا من النيتروجين الخفيف N^{14} الاعتيادي ثم نقلت البكتيريا الى وسط اعتيادي وتركت للانقسام مرة واحدة ثم تم عزل الدنا بطريقة الترسيب بقوة الطرد المركزي باستخدام محلول ملحي مشبع من كلوريد السيزيوم (**Csc1**) بطريقة الطرد المركزي المتوازن الكثافة المذكوره اعلاه، فقد وجدا العالمين بان جميع جزئيات الدنا **DNA** الناتجة من الانقسام الاول هجينه (N^{14} -N^{15}) اي ان احد الخيطين يكون ثقيل والآخر يكون خفيف . بعد انقسامين وجدا أن ٥٠٪ من الجزئيات هجينه والـ ٥٠٪ الاخرى خفيفة قد أكدت هذه التجربة على ان التضاعف يتم بطريقة الاحتفاظ النصفي .

استنساخ الاحماض النووية الرايبوزية RNAs-transcription

تتم عملية استنساخ الانواع الثلاثة للـ **RNA** من شريط مرصاف الـ **DNA** الذي يحفز بواسطة مجموعة انزيمات التي يطلق عليها **DNA-dependent RNA-polymerase** .

يطلق على الشريط المرصاف لـ **DNA** اسم الشريط الحساس **sense strand** الذي يستعمل كقالب لتخليق الشريط المتمم لـ **RNA** بعملية الاستنساخ **Transcription**.

ويستبدل في هذه العملية الثايمين باليوراسيل . بعد ذلك تتم المعالجة بازالة أو اضافة عدد من النيكليوتيدات

أو اضافة المثايل **methylation** لنيكليوتيدات معينة وفي البكتيريا يتم تحديد **0.2-0.1**% من المجموع الكروموسومي لاستنساخ **rRNA** وهذا يزود ما يعادل عشر جينات تستنسخ لـ **rRNA** اما في الكائنات العليا فتكون ٢٦٠ جين في ذبابة الفاكهة دروسوفيلا مثلاً .

ويتم استنساخ **rRNA** في حقيقية النواة في منطقة تنظيم النوية **nucleolar organizing region** والتي تحتوي الجينات الخاصة باستنساخ الـ **r-RNA** ان الجزء الاكبر من الحامض الرايبوزي يتواجد في النوية، بالاضافة الى ذلك فان منطقة تنظيم النوية تتشمن عددا من الجينات المثمائله والمتكررة المسؤولة عن عملية تخليق **r-RNA** ان **r-RNA** لا يحدد تعاقب الاحماض الامينية في سلسلة العديد بيبتيدات **polypeptides** .

بينما **m-RNA** هو الذي يحدد تعاقب الاحماض الامينية في السلسلة تبدأ عملية الاستنساخ للـ**m-RNA** بتخليق جزئيات طويلة مسبقة **Precursor** بتحفيز انزيم **DNA-dependent RNA polymerase** من احد الشريطين (القالب) للـ **DNA** ويكون فعل الانزيم على الآصرة فوسفات ثنائية الاستر (5َ<--- 3َ) وقد تم معرفة عدد من الانزيمات في النباتات والحيوانات.

ويتألف انزيم النسخ في البكتيريا المعوية من عدة وحدات ثانوية **subunits** اثنتان من سلسلة الفا وسلسلة واحدة من بيتا واخرى من بيتا فتحة **B́** وسلسلة من عامل سكيما (σ) **(б--factor)** يبلغ وزنها الجزيئي حوالي ٤٩,٠٠٠ .

فالسلسلة بيتا **B́** هي المسؤولة عن ارتباط الانزيم بالـ **DNA**.

اما العامل سيكما فهو ضروري لنشوء الاستنساخ حيث يساعد على الارتباط في منطقة المثير (المحفز) **promoter** على الـ **DNA**. يطلق على البرتينات الاربعة المكونه لانزيم البلمرة عدا عامل السيكما اسم لب الانزيم **core enzyme** كما في الشكل (٦) .

ويتم الاستنساخ بالاتجاه ($3' \leftarrow 5'$) باضافه رايبونيكليوتيدات على النهاية ($3'$) وتنمو جزيئة الـ **RNA** بعكس التوازي **antiparallel** للـ **DNA** وتكون مكملة لشريط المرصاف في الـ **DNA**.

وتنمو سلسلة **m - RNA** بسرعة حيث تتضاعف ١٥ - ٥٥ وحدة في الثانية بالنسبة للبكتريا المعوية .

يقوم انزيم النسخ اللبي **core enzyme** بفصل الـ **DNA** الى سلسلتين وعاملا على اطالة الـ **RNA** بمتابعة ترجمة المرصاف (القالب) . كما تعود سلسلتا الـ **DNA** الى الارتباط كلما ابتعد الانزيم منها . هذا يقود الى الاعتقاد الى ان انزيم النسخ يترافق مع فعالية انزيم الحل **unwindase** الذي يؤدي الى فتح حلزون الـ **DNA** كذلك يعتقد ان صندوق بريبنو **(pribnow - box)** هو سلسلة تعاقب للقواعد النتروجينية **(TATA AT)** تعمل على تسهيل عملية فصل المرصاف (القالب) عن مقابله .

يتصف الحامض النووي الرسولي **m - RNA** في حقيقية النواة باحتوائها على مناطق غير جينية **(Introns)** التي يجب ازالتها لذلك فانه يعاني تغييرات قبل تصديره من النواة الى السايتو بلازم ومن هذه التغييرات هي : التقطيع والمعالجة **splicing out and processing** .

١- أضافة تركيب القبعة **(cap)** على النهاية ($5'$) ويظهر ان هذا التركيب

ضروري لتكوين معقد بين m - RNA والرايبوسوم وبالتالي عمله في تخليق البروتين .

٢- اضافة عديد الادينوسين (A) (polyadinosine A) على النهاية(3َ) في حقيقيات النواة وهو موجود في جميع m - RNAs عدا تلك المسؤولة عن تخليق الهستونات . كما وجدت في انواع من البكتريا . ويبد أن poly - A ضرورية لمعالجة نهاية الاستنساخ وهي ليست لازمه لعملية تصنيع البروتين انما تعمل على ثبوت m - RNA .

٣- أضافة مجموعة الميثايل Methylation يعتقد انها تلعب دوراً في التعبير الجيني ويمكن ملاحظة عملية تخليق m - RNA في الشكل (٦ -) .

٤- عملية التقطيع splicing out المناطق غير الجينية بين الانترونات الاكسونات .

إن عدد النيكليوتيدات وطول جزئية الـ m-RNA يعتمد على السلسلة الببتيدية التي يكون مسؤولا عن تخليقها . فمثلا يبلغ عدد النيكليوتيدات المشكلة لسلسلتي الفا وبيتا في الهيموكلوبين اكثر من ٤٠٠ وحدة .

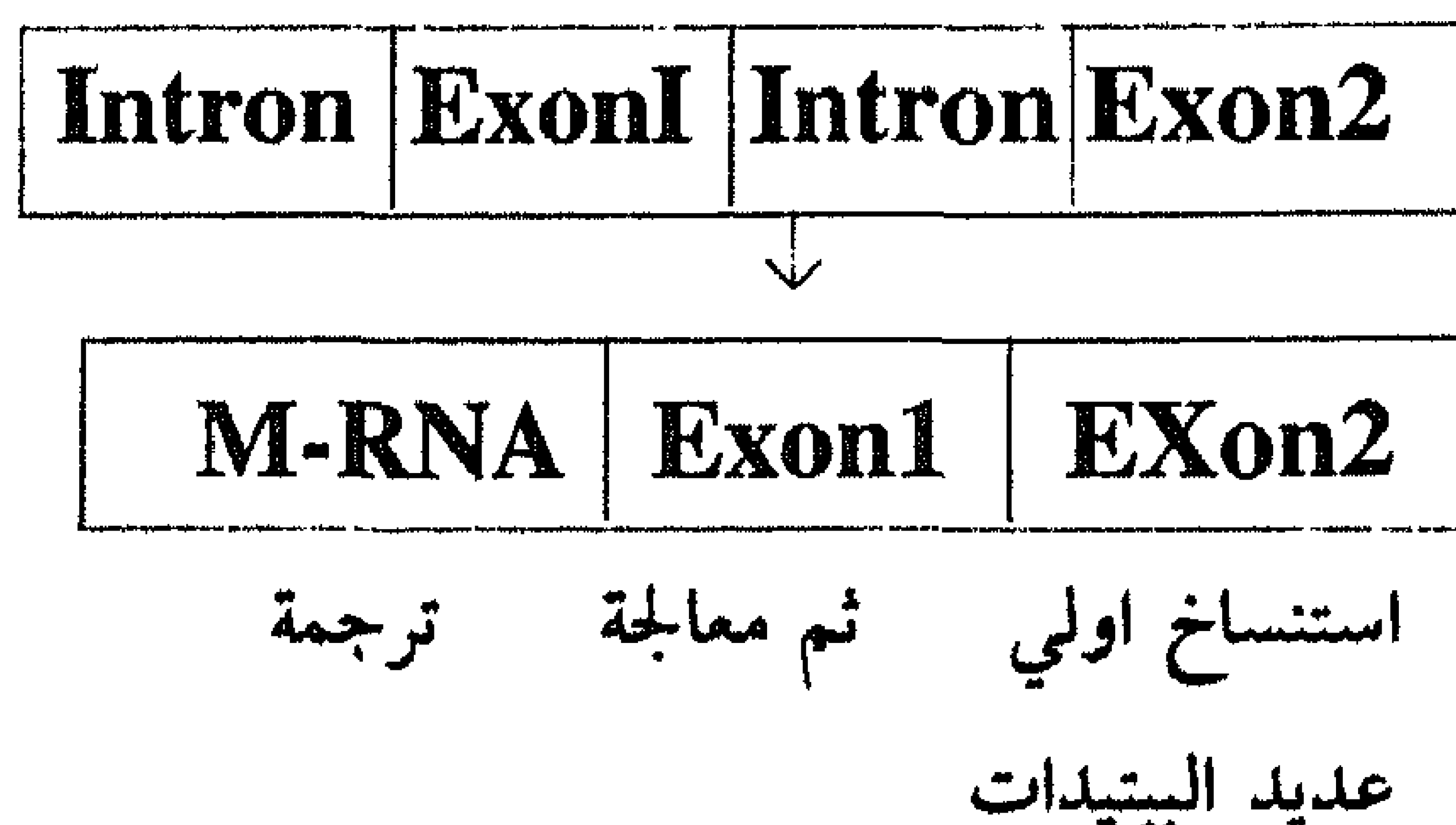
وفي الكائنات حقيقية النواة يوجد ثلاثة انواع من الانزيم المبلمر - RNA RNA polymerase وهي :

١- polymerase يقع في النوية ويقوم بتحفيز تخليق r - RNA.

٢- polymerase ويقع في العصير النووي ويقوم باستنساخ الجينات النووية التركيبية الرئيسية وهو المسؤول عن تخليص pre - m-RNA.

٣- polymerase ويقع في العصير النووي ايضاً ويقوم باستنساخ جينات للحامض النووي الصغيرة والرايبوزي الناقل t - RNA .

أما عملية انهاء نسخ الرنا **termination of transcription** فتحدث في منطقة الانهاء على الـDNA حيث توجد تتالي لقواعد عديمة المعنى (5-6u +A3) وبمساعدة اشارة تأتي عن طريق بروتين الانتهاء الذي يعرف با (Rho) بروتين أ - كما في الشكل (6)



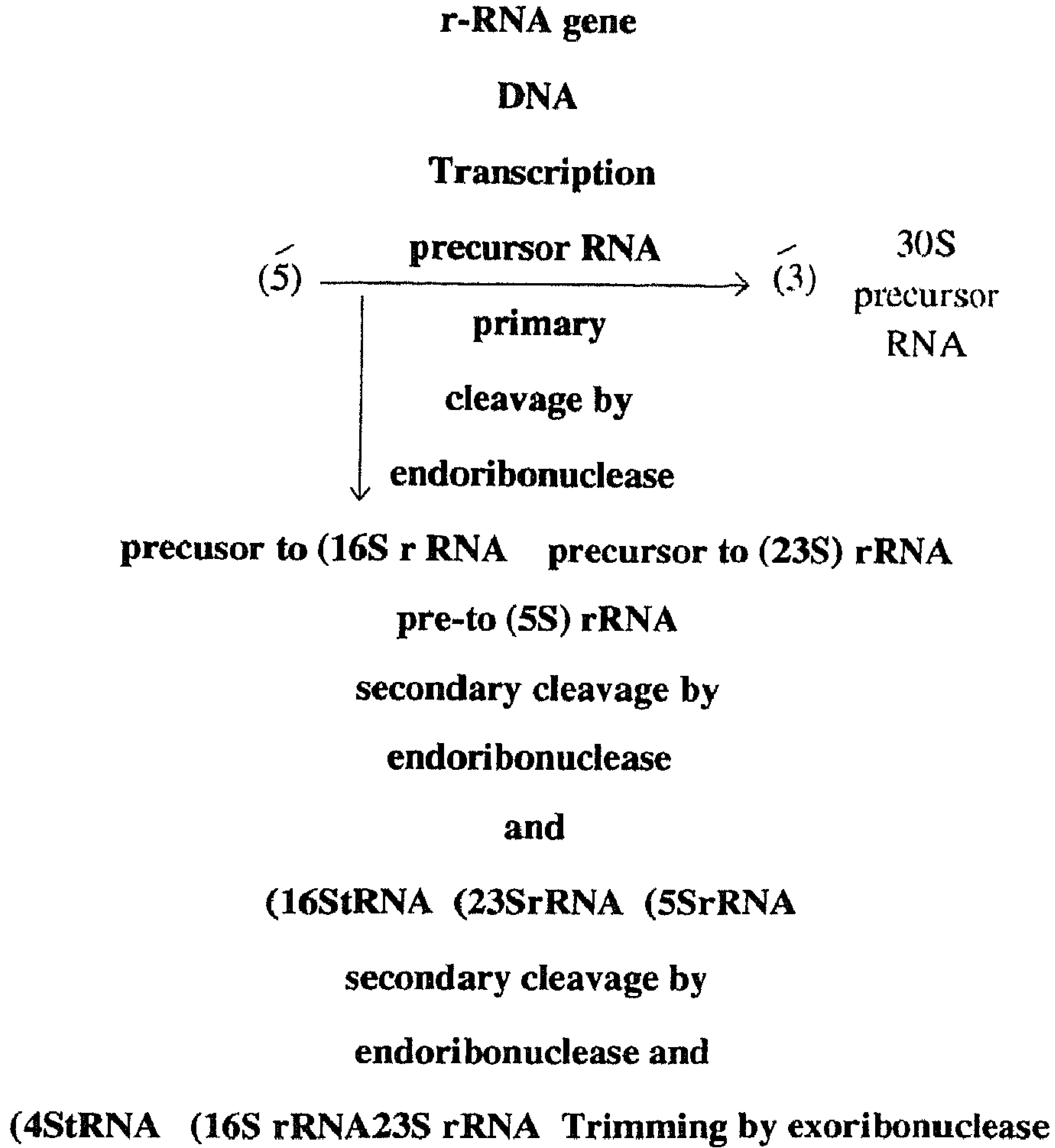
شكل (   ) يوضح عملية تقطيع الاترونات وربط الاكسونات من الاستنساخ الابتدائي في عملية معالجة m- RNA

استخدام نظير الهيدروجين المشع (3H)

إستنساخ r-RNA والمعالجة **processing** في البكتريا المعوية :-

Transcription of the E. coli r-RNA:

يمكن اجمال عملية الاستنساخ والمعالجة لـ **r-RNA** بالشكل التالي:-



ويضاف عند بلوغ **r-RNA** في المرحلة الثانوية الى **(15S) (45t RNA** أو الى الـ**(23S)** بعد الانشطار من المسبق **precursor**.

اما في حقيقة النواة فتقع جينات **r-RNA** بشكل متضاعفات في منطقة تنظيم النوية **(NOR)** للكروموسوم . فمثلا في الذرة تقع هذه المنطقه على

الكروسوم رقم(**6**) بينمـا في ذبابة الفاكـهة الدروسوفيلا فـيقع على كرومـوسومات الجـنس وفـي الانسـان تقـع هـذه المنـطقـة عـلى كـروموسـومات رقـم(**14,13**) **(22,21,15)** .

ففي البكـتيريا المعوية قدرت عـدد النسخ لجين **rRNA** بين **(5-10)** وهذا ليس مفاجئاً اذا أخذ بالاعتبار العدد الكبير من الرايبوسومات الموجودة في كل خلية.

بينما قدرت عدد نسخ الجـينات المسؤولة عن نسخ**rRNA** في حقيـقة النواة بين المئات وعدة الاف.

اما استـنساخ **t- RNA** فيتـم عن طريق الجـينات الكرومـوسومية وكـما هي الحال في **r-RNA** فان **t RNAs** يستنسـخ بشكل مسبقات كبيـرة الحجم التي تعـاني المعالجـة النهائـية للاسـتنساخ وتـشمل الانشـقاق **Cleavage** والتشذيب **Trimming** والمثيلة **Methylation** .

الفصل السادس

الانزيمات

انزيمات الاحماض النووية

وهي عبارة عن حفازات **catalysts** تعمل على تسريع معدلات التفاعلات الكيمائية. والانزيمات عبارة عن بروتينات تنتج بواسطة الخلايا الحية واغلب هذه الانزيمات تعمل داخل الخلية المنتجة لها وتسمى **intracellular** ، او انها تعمل خارج الخلايا الناتجة وتسمى **extra cellular** مثل انزيمات الهضم .

ولها خواص البروتينات مثل عمليات الهجرة الكهربائية **electrophoresis** وتغير طبيعتها (الدنترة) **Denaturation** والانزيمات اما ان تكون بسيطة او مركبة والاخيرة تتطلب وجود مواد غير بروتينية ترتبط معها بشكل ثابت .

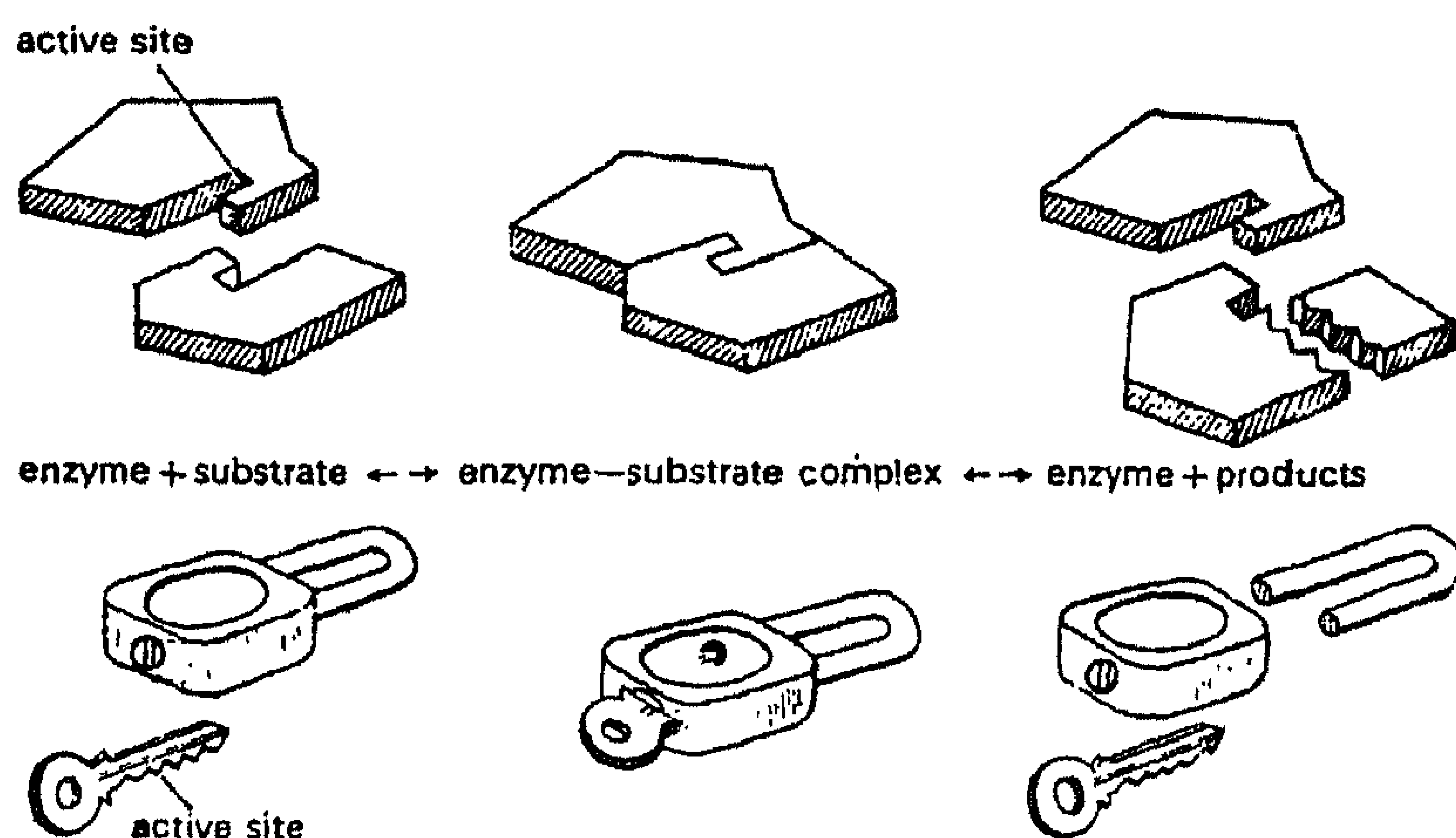
تعرف المادة التي يعمل عليها الانزيم بـ **substrate** او مادة التفاعل وتسمية الانزيمات يتأتي من اضافة المقطع **(ase-)** في نهاية اسم مادة التفاعل مثل **sucrase** الذي يعمل على السكر **sucrose** والـ **urease** الذي يعمل على اليوريا **urea** وهكذا .

ويطلق مصطلح **Apoenzyme** على قطعة عديد الببتيدات من الانزيم وعند ارتباطه مع المرافق الانزيمي **coenzyme** او العناصرالمعدنية (مثل **zn,mn,mg**) فينتج ما يسمى بالـ **(Holoenzyme)** والمرافق الانزيمي قد يكون فيتامين وعندئذ يكون الانزيم فعال على مادة التفاعل. فمثلا عمل الانزيم سكسنيك ديهيدروجينيز على حامض السكسنيك الذي ينتج حامض الفيوماريك (بدورة كريبس) يحتاج الى المرافق الانزيم **FAD** الذي يحمل **H2** المنزوع.

آلية فعل الانزيم mechanism of enzyme action

يعمل الانزيم مع مادة التفاعل على فرضية القفل والمفتاح **lock and Key**

حيث يحدث اتحاد مؤقت بين الانزيم ومادة التفاعل اذ يمتلك كل انزيم على موقع فعال **active site** الذي يثبت على المادة التي يعمل عليها وعندئذ يتكون معقد من الانزيم ومادة التفاعل الذي يقوم بتكسيرها معطيا بذلك نواتج التفاعل ثم يتحرر الانزيم والذي بدوره يمكن ان يتحد مع مادة اخرى جديدة وهكذا وكما في الشكل (٦-)



شكل (٦-) يوضح عمل الانزيم على مادة التفاعل

والانزيمات تعمل بمبدأ التخصص **specificity** وقد يكون التخصص مطلق او نسبي على المادة او رابطة معينة .

فصل وتنقية الانزيمات

تفصل الانـزيمات لا غراض مختلفـه صناعية او طبـيه وغير ذلك ثم تنـقى من المواد المختلطه معها :

الخطوة الاولى : الانزيمات داخل الخلايا

للـحصول عـلى الانزيمـات الموجودة داخـل الخلايـا يجري اولا تـكسير جدران الخلايا والاغشيه باتباع ما يلي :-

استخـدام الخلاط او الطحن بـالهاون مع الرمـل الناعم الـنظيف والرج الـسريع واستخدام مذيبات عضوية مثل الأسيتون او الكلورفورم او استعمال انزيمات محللة.

ويجب ان تحـصل العمليـة اعلاه تحت درجات حراريه مـنخفضة (تحت الـصفر المئـوي) وذلك لخفـض النشـاط الانزيمي وفـي درجة حمـوضة pH مناسبة وبذلك نحصل على محلول غني بالانزيم مذابا في المذيبات العضوية الآنفة الذكر .

الانزيمـات خارج الخـلايا : يمكـن الحصول عـلى هـذه الانزيمات وذلـك بجـمع الافرازات من اللعاب او من العصارة المعدية.

الخطوة الثانية : الفصل والتنقية

وذلك بازالة المكونات الاخرى المختلطه مـع الانزيم ومن الطرق المتبعة في ذلك هي :

١- الفصل الغشائي **Dialysis**

بما أن الانزيمات مـواد بروتينه وتمتـاز بحجومها الـكبيرة فيمـكن فصلها بـواسطة كيس من السيلوفـان او ورق البارشميت الذي يغمر في أناء يحتـوي على ماء مقطر

حيث تنفذ الأيونات والمواد غير المتأينه للخارج وتبقي جزئيات البروتين (الانزيم) في الداخل لكبر حجمها

٢- بالترسيب : باستخدام كبريتات الامونيوم .

٣- كروماتوكرافيا العمود **column chromatography** وفيها يوضع المستخلص في العمود باستخدام مذيبات معينه حسب معامل التوزيع **partition coefficent** (يمكن الرجوع الى الكتب المتخصصه في الكروماتوكرافيا للمزيد من المعرفة عن هذه التقنيه) . وبعد ذلك عند انفصال الانزيمات يمكن اجراء عملية البلورة اذ يتحول الانزيم الى بلورات .

مثبطات الانزيمات
Enzymes inhibitors

وهي المركبات التي يمكنها ان تتحد مع الانزيم وتمنع اتحاد الانزيم مع مادة التفاعل الاعتيادية وتثبيط نشاط الانزيم على مادة تفاعله والتي يطلق عليها **antimetabolites** وتقسم المثبطات الى قسمين:

١- مثبطات منافسة **competitive Inhibitors**

في هذا النوع ينتج ان المثبط له تركيب مشابه للمادة التي يعمل عليها الانزيم حيث يفقد الانزيم اتحاده مع المادة الاعتياديه ويتصل بالمادة المثبطة . وهذه التفاعلات تكون عكسيه اي انه يمكن ان يرجع الانزيم الى حالته الاولى عند زيادة نسبة تركيز مادة التفاعل الاساسية واحسن مثال على ذلك هو تثبيط السكسنات ديهيدروجينيز بواسطة حامض المالونيك الذي يعمل اساساً على حامض السكسنيك (دورة كريبس) ويطلق على هذه المثبطات بالمتخصصة .

٢- مثبطات غير منافسة **non- competitive**

وهي مثبطات غير متخصصه وفيها يتم اتحاد المثبط مع موقع على الانزيم وتتوقف سرعة التفاعل على تركيز المثبط وعلى ألفته مع الانزيم ومن الامثله على ذلك آيونات المعادن الثقيله مثل ايون الفضه والزئبق والرصاص . وهي تسبب تثبيط غير عكسي ولا يحدث تنافس . ومن المثبطات غير المتخصصه هي الحرارة العاليه والقواعد والاحماض القويه والاشعه فوق البنفسجيه حيث تعمل على مسخ الانزيم.

العوامل المؤثرة على معدل التفاعل الانزيمي

كما مر سابقاً لا حظنا ان الانزيم يتأثر بعدد من العوامل الفيزيائيه والكيميائيه التي تعمل على مسخ الانزيم (الدنترة) ومنها :

١- درجة الحرارة : يتأثر معدل تفاعل اللانزيم بدرجات الحرارة حتي درجة معينه تسمي بالحرارة المثلى **optimum (60-40)** مْ

٢- تركيز ايون الهيدروجين **(pH)**

لكل انزيم درجة حموضه معينه والتي يعمل عندها الانزيم بأقصى درجة +التي تسمى **(optimum pH)**

٣- تركيز مادة التفاعل

يزداد معدل التفاعل بزيادة تركيز مادة التفاعل حتى نقطة معينه والتي عندها يثبت معدل التفاعل الانزيمي.

٤- تركيز الانزيم

يتناسب معدل سير التفاعل تناسبا طرديا مع زيادة تركيز الانزيم على فرض ان العوامل الاخرى تبقى ثابته عند الدرجه المثلى.

٥- تأثير التغذية الراجعة (الناتج النهائي) **Feed back Inhibition**

ويحدث عندما تتوقف الخطوة الاولى في تفاعل بنائي في سلسلة من التفاعلات الانزيميه وعندئذ يتكون ما يسمى بالتغذيه الاسترجاعيه كما في المثال:



فالمركب D(ناتج نهائي) في السلسلة يمكن ان يثبط الانزيم (١)

٦- الاشعاعات مثل **uv** تعمل على تثبيط الانزيمات وكذلك اشعة β و α

كما ان الضوء يعمل على تثبيط نشاط معظم الانزيمات .

ولمزيد من المعرفه عن الانزيمات يمكن الرجوع الى كتب الكيمياء الحيويه و الفسيولوجيا .

تقسيم الانزيمات

classification of Enzymes

تنقسم الانزيمات الى مايلي :

١- انزيمات التحلل المائى : **Hydrolysase**

وهي الانزيمات التي تعمل على تكسير الروابط باضافة الماء مثل انزيمات **nucleases** التي تقوم بتحليل الاحماض النوويه مائيا الى نيكليوتيدات ومن ثم الى نيكليوزيدات واخيرا الى السكر الخماسي والقواعد والفوسفات .

وانزيمات **peptidases** والـ **Lipases** والمالتيز **maltase**

٢- انزيمات الاكسدة والاختزال : **oxidoreductases**

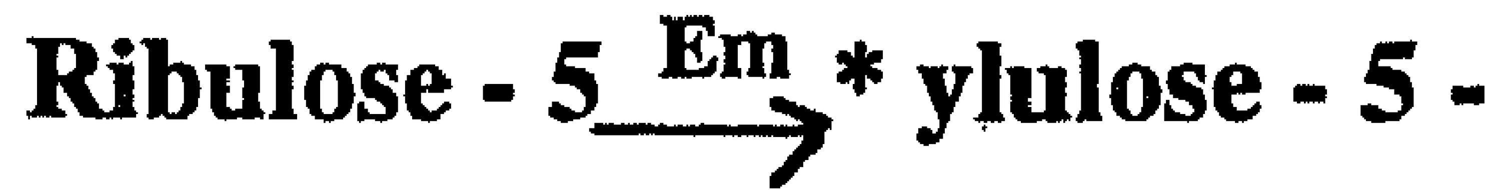
وهي أنزيمات متخصصة في عمليات الأكسدة (انتزاع الكترونات مثل الهيدروجين) والاختزال (اضافة الالكترونات) مثل الهيدروجين للمواد مثل انزيم **Dehydrogenase** والـ **Oxidase** و **Peroxidase** تحتاج إلى مستقبلات الكترونية مثل **NAD** والـ **FAD** .

٣- انزيمات النقل : Transferases

وهي انزيمات تحفز نقل مجموعة كيميائيه من مركب الى مركب أخر aminoalyltransferase .

٤- انزيمات المشابهات isomerase

وهي الانزيمات التي تعمل على تحويل مادة الى مادة مناظرة او مشابهة لها مثل **Epimerase**





٥- انزيمات الفصل Lyases

وهي الانزيمات التي تعمل علي فصل مجموعات من المادة بخلاف التحلل المائي مثل انزيمات Decarboxylase التي تعمل على فصل Co والـ **Fumarase**

٦-الانزيمات الرابطه : Ligases

وهي الانزيمات التي تحفز على ربط جزئيتين معاً ويقترن عملها بوجود مركب الطاقة ATP مثل الانزيمات الرابطه للاحماض النوويه سيأتي الحديث عنها .

الانزيمات المشابهة : isozymes

توجد بعض الانزيمات باشكال جزيئيه متعددة في نسيج معين وهي تعمل على تحفيز نفس التفاعل وتتميز من الناحية المناعيه والهجرة الكهربائيه . ومن الامثله على ذلك انزيم Lactate dehydrogenase في بلازما الدم الذى يوجد على الاقل بخمسة اشكال والتي يطلق عليها اسم isozymes فمثلا الموجود في نسيج الكبد هو أيسوزيم 5' بينما بالقلب يوجد ايسوزيم (1,2)

مضادات الانزيم : Antienzymes

وهي عبارة عن برتينات او مواد مشابهة للبروتينات التي تنتج في جسم الكائن الحي والتي تعمل على تثبيط فعل الانزيم .

وتتضمن هذه مضادات لا نزيم البيبسين والتربسين كما في بعض الديدان الطفيلة مثل الاسكارس ولهذا السبب فانها لا تهضم داخل الامعاء التي تعيش فيها كما توجد مضادات انزيم الاميليز.

الاهمية الطبيه لبعض الانزيمات
Diagnostic applications of Enzymes

يعتبر قياس النشاط الانزيمي في السوائل الجسيميه مثل بلازما الدم من الطرق المستخدمه لتشخيص بعض الامراض مثل انزيم تخثر الدم والانزيمات الناتجة من تكسر الكريات الدمويه الحمر والبيض فعند موت الخليه فان انزيماتها تدخل مجرى الدم فعند زيادة مستوى انزيم معين في الدم غالباً ما يكشف عن ضرر او تلف للانسجة كما يحدث في التهاب الكبد الفايروسي **hepatitis** وفي حالة الذبحة القلبيه مثلا وفي الجدول التالي يوضح اهمية بعض الانزيمات المستخدمة في التشخيص السريري.

جدول (٦-١) يبين بعض الانزيمات المستخدمه في التشخيص السريري

التسيج المصاب	المستوى	الانزيم
البنكرياس والكبد ومرض السكري	منخفض في البلازما	amylase
الذبحه القلبيه .اللوكميا والاورام السرطانيه	مرتفع في الدم	Lactic dehyrdgenase
سرطان البروستات	مرتفع في الدم	Acid phosphatase
لين العظام الكبد عند الاصابه باليرقان		ALkaline phosphase
الذبحة القلبيه تلف الكبد	مرتفع في الدم	Glutamic oxaloacetic Transaminase
العضلات القلب والمخ	طبيعي 2%	Glutamic pyruvic Transaminase
تليف الكبد الاصابات البكتريه الحمل	مرتفع	cerulo plasmin
امراض الكليه مرض الكبد	مرتفع	cholinesterase
التسمم بالمبيدات الحشرية	منخفض	
الكبد - اورام المخ التهاب السحايا	مرتفع	isocitric dehydro-hendse (IcD)

انزيمات الاحماض النوويه
Nucleic Acid Enzymes

يمكن تقسيم الانزيمات العاملة على ايض الاحماض النوويه الى ثلاثة مجموعات وهي :

انزيمات البلمرة **polymerization**

انزيمات التحويرات **modification**

الانزيمات المحللة **degradation**

فانزيمات البلمرة: **DNA-polymerase** والـ**RNA-polymerases** تعمل على اضافة النكليوتيدات وذلك باضافة الفوسفات الاحاديه الى النهاية(**3-OH**) .

اما انزيمات التحويرات فتشمل ثلاثة طرق هي :

١-التغيرات الكيميائيه في زيادة او نقصان طول السلسلة التي تم استنساخها كما هي الحال باضافة مجموعة الميثايل **methyl group** .

٢- انزيمات القطع والتشذيب **cutting and trimming**

كما يحصل عند معالجة ال**RNA** حيث يحصل شطرللسلسة في مواقع محددة وازالة الاجزاء غير المستعملة من جزيئ الـ **RNA**

٣-انزيمات المحورة التي تعمل على زيادة طول السلسلة مثل انزيم **ligase** الذي يقوم بربط قطع ال**DNA** او قطع **RNA**

ثم انزيمات الاضافة النهائيه **Terminal addition enzymes** التي تقوم باضافة الى البادئ في الـ **DNA** والـ **RNA** دون الحاجة الى المرصاف **template** كما هي الحال باضافة **CCA** الى النهاية (3َ) في **tRNA** واضافة (**A**) **poly** الى النهاية (**3َ**) في**RNA -m** لحقيقة النواة.

اما بالـنسبة لـلمحلـلة فتشـمل على انـزيمات **DNAses** وال **RNAses** والإنزيمات القاطعة (المقيدة) **restriction endonucleases**

انزيمات البلمرة DNA

أ- في البكتريا المعوية E.coli

تمتلـك خلايا البـكتريا المـعوية **E.coli** ثلاثة انـزيمات للبـلمرة ويطـلق عليـها ١ , ٢ , ٣ .

فالاول هام واساسي في تضاعف ال **DNA**

كما انه يقوم باصلاح الـ **repair of DNA** نتيجة التلف بسبب الاشعة او العوامل الكيماوية .حيث ان له فعالية محللة من النهاية (3َ--> 5َ)

وهو المسؤول عن حذف (بتر) البادئ في تضاعف الـ **DNA**

ويبلغ وزنه الجزئي ١٠٩،٠٠٠ دالتون ويتكون من٤٠٠ جزئية

اما الانزيم المبلـمر الثاني (2) لايعرف له وظـيفة بشكل مـحدد ويعتقد انـه يقوم باصلاح الـ **DNA** عند عدم وجود الانزيم الاول اما انزيم المبلمر الثالث (3) فيبدو انه له دور اسـاسي لا يستغـني عنه في عـملية تضـاعف الـ **DNA**. لاحظ الفصل الثالث .

ب- في حقيقة النواة :

تمتلك خـلايا حقيقيه الـنواه اربع من انزيمات بـلمرة الدنا وهي مما ثـلة لانزيمات البلمرة في بدائية النواة (البكتريا)

وتسمى بألفا (α) وبيتا (β) ويوجدان في نواة الخلية وكَاما (δ) ويوجد في الميتوكوندريا والـبلاستيدات الخضراء وربما يكون مسؤولاً عن تـضاعف الدنا في هذه العضيات اما الرابـع فقد عزل من نخاع عظم الارانب والغدة التايمـوسية في العجول ويطلق عليه سيكما (σ) ولا يعرف دوره بالضبط».

انزيمات البلمرة للـ RNA

أ- في البكتريا المعوية E. coli

تعمل انزيمات البلمرة للـ RNA على تحفيز استنساخ transcription الرنا من جزئيات الدنا.

وقد نالت انزيمات البلمرة في البكتريا المعوية دراسات مستفيضة وله وزن جزئي مقداره (490,000) ويتكون من ست من عديدات الببتيدات .

يتألف الانزيم من جوهر الانزيم core enzyme ويتكون من وحدات ثانوية من جزيئتين من عديد الببتيدات تسمى (α) الفا

ومن جزئية β وبيتا فتحة (β') وw بالاضافه الى المرافق لجوهر الانزيم وحدة ثانوية تسمى سيكما (σ) وهي لازمة لنشوء عملية الاستنساخ وليس لها وظيفة محفزة .

ويتحرر العامل سيكما بعد بدء تخليق الـ RNA وتتم اطالة السلسلة بتحفيز من لب الانزيم . اما العامل سيكما فانه يعمل على ربط الانزيم في الموقع الصحيح على الدنا والمسمى بالمحفز promoter يوجد اكثر من خمسين محفز في البكتريا المعوية .

ب - في حقيقة النواة

توجد ثلاثة انواع من انزيمات البلمرة للرنا من خلايا الخمائر حتى خلايا الثديات ويطلق عليها (١) و(٢) و (٣)

الاول يتواجد في النويه ويعمل على تخليق r-RNA.

الثاني والثالث يقعان في عصير النواه . فالثاني يقوم باستنساخ عدد كبير من الجينات التركيبية المسؤولة عن تخليص الـ pre m- RNA .

اما الثالث فيقوم باستنساخ جينات الرنا الناقل t-RNA

الانزيم الناسخ العاكس: Reverse transcriptase

تمتلك جميع الفايروسات الارتكاسيه (القهقرية) Retroviruses على الانزيم الناسخ العاكس وهو الانزيم الذي له فعالية استنساخ الدنا D N A من الحامض النووي الرايبوزي R N A (بالتيمور (1972Baltimore) اذ وجد ان بعض الفايروسات الحيوانية والحاملة للـ RNA كمادة وراثية تمتلك هذا الانزيم ومن المعروف ان بعض الفايروسات القهقريه تسبب السرطان مثل الساركوما واللوكيميا في الطيور والجرذان وفايروس نقص المناعة المكتسب (المسبب للمرض المعروف بالايدز)

ويعمل هذا الانزيم عند وجود m-RNA النقي كقالب لتخليق الدنا المتمم (cDNA) حيث يحفز هذا الانزيم التفاعل بالاتجاه RNA—> DNA .

ويتوسط هذا الانزيم على تحويل المعلومات الوراثيه الموجودة على الشريط المفرد للرنا الى شريط مزدوج للدنا.

وتستخدم هذه الطريقه في تقنيات الهندسة الوراثيه التي سيأتي الكلام عنها في الفصول القادمة. اذ تستخدم جزئيات الدنا المخلقه بهذه الطريقة على الاندساس في كروموسومات الفاج او البلاز ميدات بواسطة الانزيم الناقل النهائي terminal transferase ومن ثم تنسيلها (clone).

(II)- انزيمات المحورة modification- Enzymes

١-انزيم المثيلة methylases

تعتبر عملية مثيلة الاحماض النوويه من اكثر عمليات التحوير ففي DNA النبات تشكل (5-methylcytosine) حوالي 5-6%

وفي DNA الحيواني تشكل حوالي2-7% كما وجد ان هناك حوالي (40) من مثيلة القواعد النتروجنية تحصل لل t-RNA كما ان تركيب القبعة على النهاية '5 في حقيقية النواة يتضمن مجموعات من ال methyl

وقد تم اكتشاف العديد من انزيمات المثيلة وتمت تنقيتها - وتفاعلات المثيلة تتطلب مجموعة methyl تنقل الى الحامض النووي من واهب للميثايل مثل s-adenosylmethionine ان دور عملية المثيلة للحامض النووي DNA هوحمايته من الانزيمات القاطعة في البكتريا وذلك باضافة مجموعة الميثايل CH_3 الى الادنين أو السايتونين أما دور عملية المثيلة بالنسبة للـ RNA فغير معروفه لكن هنالك بعض الادلة التي تؤكد على ان عملية التحويل باضافة الميثايل في الرنا الناقل (t-RNA) تزيد بشكل كبير العمل الوظيفي له.

وتحتل مجموعات الميثايل موقع على كاربون رقم ('5) في البريميدنيات عند الاخدود الرئيسي الكبير في الدنا . وتلعب دوراًكبيراً في تفاعلات الدنا مع بعض البروتينات الخاصة وهذا ما لوحظ في اضافة او أزالة مجموعة الميثايل على lac-operon في البكتريا المعوية التي تعمل على تغير آلفة الكابح repressor مع الرنا .

وتشير بعض الادلة والدراسات الى ان المثيلة لها دور في عملية تنظيم التعبير الجيني في حقيقة النواة حيث أن :

١- هناك علاقة بين مستوى التعبير الجيني ودرجة المثيلة فعندما تقل المثيلة يزداد التعبير الجيني والعكس بالعكس .

٢- والمثيلة تتخصص بها بعض الانسجة وان اكثر من ٩٠٪ من المثيلة للدنا في حقيقة النواة يحصل في الوحدات CG .

انزيمات الاضافة النهائيه Terminal addation enzymes

وتشمل على الانزيمات الناقلة النهائيه terminal transferascs حيث تعمل هذه المجموعة من الانزيمات على اضافة قواعد مفردة اوقطع مكررة من الدنا repetitive DNA على النهاية 3' لسلسلة الرنا او الدنا ومن احسن الامثلة على ذلك هي اضافة القواعد CCA على نهاية الرنا الناقل التي تعتبر مستقبلات لنشاطه . كما ان اضافة عديدات الادنين poly -A الى m-RNA في الكثير من خلايا حقيقية النواة على النهاية ٣ بعد عمليةالاستنساخ اصبحت معروفة التي تتم انزيمياً وقد وصفت هذه الانزيمات بشكل تفصيلي ، الا أن تفاصيل وهدف اضافة ال poly -A- لا يزال غير واضح .

وقد لوحظ ان اضافة الـ poly-A- يتم تثبيطها بواسطة (3deoxyadenosine (3dA) حيث تكون الانزيمات الخاصة باضافة polyA حساسة لل . (3dA)

ويستعمل الانزيم الناقل النهائي في طرق الهندسة الوراثيه اذ انه لازم لتخليق جزئيات متمة وربطها على النهاية ('3) لشريط الدنا في تقنية اعادة اتحاد الدنا Recombinant DNA .

انزيم الربط DNA - ligase

تعمل هذه الانزيمات على ربط قطع عديدات النكليوتيدات وهو هام للكثير من الكائنات الحية لتضاعف الدنا حيث انه يعمل على ربط قطع اوكازاكي (لاحظ تضاعف الدنا) كما يحفز على عملية اصلاح الدنا بعد التلف الذى يصيبه عند التعرض للاشعاع او التكسر وفي عملية اعادة اتحاد جزئيات الدنا Recombination فالانزيم الرابط هو المسؤول لهذه المهمات الشاقة الذي

يعمل على ربط النهاية '5 للفوسفات مع النهاية '3 للهيدوركسيل في جزيئة السكر المجاورة .

يستعمل الانزيم في البكتريا المعوية DPN كعامل مساعد بينما الانزيم في الخلايا الحيوانيه يستعمل ATP كعامل مساعد وكذلك الخلايا المستحثة بواسطة الفاجات T4 و T7 .

الانزيمات المحللة Endonucleases

ويطلق عليها كذلك بالانزيمات الهاضمة للـ DNA وللـ RNA وهي تعمل على تقطيع الاحماض النووية الى قطع صغيرة oligonucleotide وتستعمل كثيرا في المختبرات عندما يراد هضم هذه الاحماض ويطلق عليها DNAses والـ RNAses-

(1) RNAses

وتقسم الى عدة اقسام وهي DNASE(1)

وهذا الانزيم يعمل على تكسير الشريط المفرد الى قطع بدون تمييز ويترك النهائية 3(OH) وعندما يكون عدد التكسيرات كافيا فانه يعمل على تهدم الدنا المزدوج الاشرطه.

DNAse (2)

وهذا الانزيم يحصل عليه من الطحال او الغدة التايموسية ويعمل على الحلزون المزدوج الاشرطه ويترك عند النهاية للفوسفات وبدون مواقع متميزة .

nuclease S1 (3)

وهذا الانزيم امكن الحصول عليه من الفطر Aspergillus oryzae ويستطيع هضم وتحطيم الشريط المفرد في حين يبقى المزدوج .

ويحصل عليه مـن البنكرياس ومن RNAses T1 تستعمل هذه الانزيمات بشكل واسع في المختبرات. وتوجد في جميع انواع الخلايا .

وتقـوم بشطر الـشريط المفـرد للرنـا في مناطـق تشكـل الفوسفـات الحلقيـة بين الموقعين(2 OH و3) للرايبـوز . يمكن غلق هذه الدائرة بـاضافة مجموعة الميثايل الى (2OH) من الرايـبوز يتبع ذلـك تحوير في جـزئية RNA الخلوية .ويقطع الانزيم الرنا عند القواعد (البريميدينات) المستخرج من البنكرياس

بينما الانزيم المستخرج من البكتريوفاج T1 فانه يهاجم الرنا عند الكوانين .في حين وجدان الانزيم لـ T2 يقطع اي اصرة من بالداخل .

وقد اكتشف حديثاً انزيم هاضم للرنا في الفطر**Aspergillus ustilago** الذى يعمل على شطر الرنا عند البيورينات ويطلق عليه **RNAse U2**

ومن الانزيمات الغريبة اكتشف ما يسمى **Ribonuclease H** في الخلايا وفـي الفايروسات القهـقريه الذى يعمل عـلى تحلل الرنا تحلـلا مائياً والذى يهجن مع الدنا .

كما انه ضروري لازالة البادئ RNA عند تخليق وتضاعف الدنا وفي الخلايا المصابه بالـفيروسات القهقريه فانـه يلعب دوراً في بناء الدنا واندسـاس دنا الفايروس في دنا الخليه المصـابة وهذا الانزيم يزود عامل للتحطيم الاختـياري لاجزاء الرنا عند تهجين DNA -RNA .

الانزيمات المحللة خارجيا Endonuclease

وهي انزيمات تـعمل على تكسـير الاحماض النوويـه من النهايات بعـكس فعل الانزيمات ذات الفعاليه الداخلية **Endonuclease**

التي تكسر الاحماض النوويه بالتقطيع من داخل السلسلة وتتميز هذه الانزيمات بفعاليتها بالاتجاه (3َ<-- 5َ)

حيث تعمل على تحفيز ازالة النكيلوتيدات واحدة بعد اخرى من النهاية (3') في السلسلة كذلك لها فعالية من النهاية كما (3'<-- 5') تلاحظ في البكتريا المعوية .

ويتميز فعل هذه الانزيمات عن انـزيمات البلمرة بـالمواقع الفعالة المـوجودة على البروتينـات الانزيميه بمعنى ان الموقع الفـعال للبلمرة بالاتجاه (3'<-- 5') يـختلف عن الانزيم المحلل بالاتجاه (3'<-- 5')

وتلعب هذه الانزيمـات وانزيمات البلمرة دوراً مهماً في عمـليات ايض الحامض النووي **DNA** .

تقوم انزيمات البلمرة في البكتريا المعوية بوظيفة **Exonuclease** التي تعمل على تـصحيح القراءة لـتسلسل الـنكيلوتيـدات وخاصة عندمـا يصيب قطع مـن الدنا التلف نتيجة التـعرض للاشعة فوق البنفسجية الاشعاعات الاخـرى او عوامل مختلفه كيميائيه كذلك في ازالة البادئ **RNA** من الدنا اثناء عملية التضاعف .

اما فـي حقيقـة النواة فـان الفعالـيه المحللـلة بالاتجـاه (3'<-- 5') تتم عن طـريق انزيمات منفصله عن انزيمات البلمرة .

الانزيمات المشكلة لتوبولوجية الـ DNA
Topoisomerases

تم حديثاً اكتشاف بعض الانزيمات التي تعمل على تغير في اشكال الحامض النووي DNA حيث انها تعمل على تحوير طوبوغرافيا الدنا من خلال فعل انزيم احدهما يطلق عليه رقم ١ حيث انه يحفز على تحوير اللف الفائق للدنا الى الشكل المستريح (دون لف) وخاصة قبل عملية التضاعف .

اما الثاني ويطلق عليه رقم٢ فعمله بعكس الاول اذ يحفز على تكوين اللف الفائق ونشاطه يزداد بعد تضاعف الدنا لغرض احتوائه داخل الخليه .

كما يعتقد انها لها دوراً في عملية استنساخ الرنا وفي عملية اعادة اتحاد الدنا Recombinant DNA.

يمكن تتبع فعالية الانزيمين بتقنية الطرد المركزي متدرج الكثافه والترحيل الكهربائي .

الانزيمات القاطعة (المقيدة)
Restrication endonucleases

وهي الانزيمات التي تحفز على قطع شريط الدنا داخليا وفي مناطق محددة site - specific وعملها هو التميز بين الدنا المتماثل الذي تحافظ عليه والدنا الغريب التي تعمل على تحطيمه .

ويعتقد ان عملية التمييز تترافق مع وجود مجموعة الميثايل على احدى التسلسلات فبوجودها تمنع الانشطار والعكس بالعكس .

أن اول انزيم قاطع تم التعرف عليه وعزله من Hemophilus influenza ويطلق حاليا على هذا الانزيم بالـ Hin(2

وفي الجدول التالي يوضح انواع الانزيمات القاطعه في كائنات حيه مختلفة .

جدول (٦-١) يوضح التسلسلات المتميزه ومناطق الانشطار للانزيمات القاطعة

الانزيم المصدر

Enzyme	Source	Site of Action
Aat II	*Acinetobacter aceti*	GACGTC CTGCAG
Bam HI	*Bacillis amyloliquefaciens*	GGATCC CCTAGG
Bgl II	*Bacillus globigii*	AGATCT TCTAGA
Eco RI	*Escherichia coli*	GAATTC CTTAAG
Hind III	*Haemophilus influenzae*	AAGCTT TTCGAA
Pst I	*Providencia stuarti*	CTGCAG GACGTC
Sma I	*Serratia marcescens*	CCCGGG GGGCCC
Xho I	*Xanthomonas holcicula*	GTCGAG GAGCTC
Xma I	*Xanthomonas malvacaerum*	CCCGGG GGGCCC

ان الخلايا الحاوية على هذه الانزيمات تستطيع حماية حامضها النووي **DNA** من فعل هذه الانزيمات وذلك باضافة مجموعة الميثايل بعد عملية التضاعف مباشرة بتحفيز من انزيمات **methylases** .

بينما تعمل هذه الانزيمات على تقطيع جزئيات الدنا الغريب الداخله من كائنات اخرى الى خـلايا المضيف وفـي عدد ثابت من الـقطع وهذا يعـتمد على عـدد مواقع القطع في كل جزئية من الدنا .

ومن السمات المفيدة لهذه الانزيمات هي ان قطع الاشرطه المزدوجة يتم من نقاط مختلفه .

تلـعب هـذه الانزيمـات دوراً هاماً فـي الهـندسـة الوراثيـه وفي تجـارب تكـوين النسلات **clones** .

الفصل السابع

كيمياء البروتينات

البروتينات PROTEINS

البروتينات PROTEINS

البروتينات مكونات اساسية في جميع الخلايا وهي اغلب المركبات العضوية الموجودة في جميع الخلايا الحية وتشكل حوالي ٥٠٪ من الوزن الجاف للخلية .

وهي عبارة عن بوليميرات من الاحماض الأمينية تتراوح اوزانها الجزيئية **Molecular Weight** من عدة الأف الى عدة ملايين دالتون . تتكون كيميائياً من الكربون ٥١٪ وهيدروجين ٧٪ واوكسجين ٢٣٪ ونيتروجين ١٦٪ وكبريت ٣-١٪ واقل من ١٪ فسفور .

وترتبط الاحماض الامينية المكونة للبروتينات مع بعضها بواسطة روابط تسمى بالببتيدات **Peptides (-CO - NH2 -)** .

تقسم الاحماض الامينية تبعاً لعدد مجموعات الأمين والكربوكسيل والمجاميع الألكيله (**R**) وعددها عشرون حامض اميني الى ما يلي : -

(١) احماض امينية قاعدية **Basic amino acids** .

(٢) احماض أمينية حامضية **Acidic amino acids** .

(٣) احماض أمينية متعادلة **Neutroal amino acids**.

وتشمل الاحماض الأمينية القاعدية على الارجنين والليسين ويدخلان في تركيب البروتينات النووية المسماة بالهستونات، وعادة تحتوي هذه المجموعة على مجموعتين من الأمين ومجموعة واحدة من الكربوكسيل .

اما الحامضية فتحتوي على مجموعتين من الكربوكسيل ومجموعة واحدة فقط من الأمين وعادة توجد في الانسجة على هيئة أميدات **Amides** مثل حامض الجلوتاميك يكون على صورة جلوتامين وحامض الأسبارتيك يوجد على صورة اسباراجين **Asparagine** اما المتعادلة فتكون كما يلي :

(أ) عطرية **Aromatic**

مثل الفينايل، الألنين والتيروسين .

(ب) كبريتية **Sulphuric**

مثل المثيونين وهو الحامض الاميني البادئ في عملية صناعة البروتين في خلايا بدائية النواة (البكتيريا) وخلايا حقيقية النواة (الخلايا الحيوانية والنباتية) .

كما تشمل على الحامض الاميني الـ **Cystine** والـ **Cysteine** .

(جـ) احماض امينية الفاتية **Aliphatic** وهي التي تحتوي على مجموعة أمين واحدة ومجموعة كاربوكسيل واحدة ومنها الكلايسين والفالين والألنين وليوسين .

(د) احماض امينية هيدروكسيلية مثل السيرين والثريونين .

(هـ) الحلقية غير المتجانسة **Heterocyclic** مثل التربتوفان والهستادين والبرولين .

بالاضافة الى ذلك يوجد اكثر من ١٥٠ حامض اميني في الطبيعة وبشكل خاص في الانسجة النباتية ولكنها لا تظهر في البروتينات وتؤدي وظائف بايولوجية هامة كمركبات وسطية في مسارات الايض الحيوي، كما توجد بعضها في خلايا الكبد او القلب، وفي تركيب جدران البكتيريا، وفي تركيب بعض المضادات الحياتية .

خواص الاحماض الأمينية

١- تذوب في الاحماض والقواعد .

٢- قابلية ذوبان اغلبها في الماء عدا التيروسين والسيستين .

٣- لها القدرة على التفاعل مع مواد مختلفة لأنها تحمل :

أ- مجموع الأمين ب - مجموعة الكربوكسيل جـ- مجموعة الالكيلية .

تتفاعل مجموعة الأمين مع الاحماض فتكون املاح كما تتفاعل مجموعة الكربوكسيل مع القواعد لتكوين الاملاح ايضاً .

التفاعلات اللونية :

(١) تتفاعل مع النهيدين **Nin - hyrin** لتكوين مركب ازرق اللون

(٢) يتفاعل الارجنين (مجموع جوانيدو **Guanido group** C= ‖ NH)

مع ألفا - نافثول **&-Naphthol** مكونا لونا احمر . ويسمى بتفاعل سكاجوشي **Sakaguchi** .

(٣) تفاعل التيروسين (مجموعة الفينول) مع نترات ونتريت الزئبق تعطي لون احمر بالحرارة ويسمى بتفاعل ميلون **Millon** .

البيبتدات

Peptides

ترتبط الاحماض الامينية مع بعضها البعض بواسطة روابط بيبتدية

$$-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-\overset{H}{N}-$$

بعد فقدان جزئية ماء H_2O حيث ترتبط مجموعة الامين لحامض اميني مع مجموعة الكربوكسيل لحامض اميني آخر وعند اضافة احماض امينية اخرى فأنه يتكون عن ذلك عديد البيبتديات **Polypeptides** ويحتوي الحامض الاميني الاول على مجموعة أمين حرة والحامض الاخير في السلسة يحتوي على مجموعة كاربوكسيل حرة .

وجزئ البروتين الناتج يتكون من سلاسل عديد البيبتيدات التي قد تكون مستقيمه او حلزونية او ملتفة . تحدث هذه العمليات اثناء عملية تخليق البروتين على

الرايبوسومات في الخلية (والتي سيأتي الحديث عنها في الفصول القادمة) ويكون تسلسل الاحماض الامينية طبقاً للشفرة التي تحصل من قبل الحامض النووي DNA.

ترتبط سلاسل عديد البيبتيدات في جزيء البروتين بالروابط التالية :

O
‖
(أ) - الروابط الهيدروجينية وتتم بين مجموعة أمين مع مجموعة كاربونيل— H —

(ب) - الروابط ثنائية الكبريت (S-S-) كما هو موجود في الجلوتاثيون **Glutathion** وهوعبارة عن بيبتيد ثلاثي احماض امينية (كلايسين والسيستئين وحامض الجلوتاميك) ويرجع نشاطه الى مجموعة **Sulfhydryl-SHC** تنتج الروابط ثنائية الكبريت عند اتحاد جزئيين من السيستئين بالاكسدة السيستين **Cystine**.

اكسدة



اختزال

تلعب هذه الروابط دوراً مهماً في ثبات التركيب الثلاثي للبروتينات .

(٣) رابطة الاملاح : **Salt - linkage** .

تحصل هذه الرابطة بين مجموعات سالبة وموجبة الشحنة على السلاسل الجانبية للاحماض القاعدية والحامضية في التركيب الثلاثي للبروتينات .

التركيب البنائي للبروتينات .

إن بناء جزيء البروتين له اربعة مستويات **Levels** هي :

١- البناء الاولي : **Primary Structure**

ويتحدد هذا البناء بنوع وعدد الاحماض الامينية وتتابع ترتيبها في السلسلة البيبتيدية .

وقد درس تتابع الاحماض الامينية في هـورمون الانسولين المفرز من قبل خلايا البنكـرياس بواسطة العالـم سانجر وزنه الجزيئي ٥٧٣٣ دالـتون ويتكون من سلـسلتين ببتيـديتين متصلتين مـع بعضهما بواسطـة رابطة ثنائية الـكبريت ويكون شكلـها خطي وكذلك انزيم رايبونيوكليز .

٢- البناء الثانوي :**Secondary Structure**

وهو المستوى الذي يتعلـق بوضعية الـتركيب التكـويني **Conformation** للسلاسل الـببتيدية وهو يمثل التـفاف هذه السلاسل بشكل حلـزوني **Helix** ويثبت هذا البناء عدد من الروابط اهمها الروابط الهيـدروجينية ويتخذ الشكل الحلزوني عدد من النماذج .

أ- حلزون الفا **Helix**- α-

ويتميز بوجود ٦ر٣ وحدة حامض اميني لكل دورة والمجاميع **R** تبرز للخارج.

ب- الصفيحة المطوية

تترتب سلاسل البيبـتايد بعضها على بعض لتكون اشكالاً يطلـق عليها الصفائح المطوية .

٣- البناء الثالثي .

يتضمن الـتركيب الثالثي لـلبروتينات ابعاد ثـلاثية للبروتين الكـروي والذي ينتج عن المجاميع الجانيـبية مع بعضها حيث تكون سـلسلة الببتيدات مطويـة بشدة وترتبط مع بعـضها بواسطـة . روابط الهيدروجـين - روابط ثنائي الـكبريت - روابط أيـونية وقوى فاندرفال .

٤- البناء الرباعي .

وهو ترابـط مجموعة الوحـدات الثانوية لـلبروتين سواء كـانت متشابهـة أم غير متشابهة مثل جزيئة الهيموكلوبين .

طرق تقدير كمية البروتين :

أ- طريقة كلدال : وتتم بواسطة هضم البروتين بواسطة حامض الكبريتيك المركز وضرب الناتج في ٦,٢٥ .

ب- تقدير البروتين بعد الاستخلاص بالامتصاص للاشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٨٠ نانوميتر .

جـ- طريقة بيرويت : وهي تفاعل البروتين مع كبريتات النحاس بوجود قاعدة قوية مثل NaOH فيتكون محلول بنفسجي يمتص عند طول موجة ٥٧٠ نانوميتر.

د- طريقة كيوكالتو - فولن : وهي طريقة لونية ينتج عنها لون ازرق يمتص الاشعة عند ٧٥٠ نانوميتر، وهي اكثر حساسية من طريقة بيرويت .

تقسيم البروتينات Classification Of Protein

تشكل البروتينات المكون الاساسي للخلايا الحيوانية والنباتية والبكتيريا تركيباً ووظيفة فهي تقوم بتحفيز التفاعلات البيوكيميائية المختلفة في الخلايا كأنزيمات كما انها تنظم هذه التفاعلات كهورمونات وتوجد ضمن أغلفة الخلايا وتدخل في تركيب عضيات الخلية في النواة والميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء وغيرها .

أ- تقسيم البروتينات حسب التركيب

١- البروتينات البسيطة Simple Protein وتشمل على :

- الالبومين Albumin ويشكل زلال البيض ويوجد في مصل (سيرم) الدم ويذوب في الماء .

- الكلوبين Globin توجد في الدم ومنها الاجسام المضادة Antibodies المناعية لا تذوب في الماء وانما بمحاليل الاملاح المخففة .

- الهستونات **Histones** وهي بروتينات قاعدية تحتوي على الارجنين واللايسين توجد في الخلية متحدة مع الاحماض النووية مشكلة البروتينات النووية **Nucleo Protein** تذوب في الماء .

- القرنيات **Scleroproteins** لا تذوب في الماء مصادرها حيوانية فقط لا تذوب في الماء توجد على شكل كيراتين **Keratin** (في الشعر والجلد والاظافر) .

٢- البروتينات المقترنة: **Conjugated Proteins**

- البروتينات الدهنية **Lipoproteins** توجد في أغلفة جميع انواع الخلايا وفي بلازما الدم .

- البروتينات النووية **Nucleoproteins** وهي التي توجد متحدة مع الاحماض النووية في انوية الخلايا مثل الهستونات والبروتامين .

- البروتينات الملونة **Chromoproteins** ترتبط هذه البروتينات مع مواد ملونة كما في الهيموكلوبين .

- البروتينات السكرية **Glycoprotein** وهي بروتينات بسيطة متحدة مع السكريات ومنها الهيبارين **Heparin** الذي يمنع تجلط الدم في الاوعية الدموية والميوسين الموجود في اللعاب . كما توجد على السطح الخارجي لاغلفة الخلايا وتلعب دوراً هاماً في كثير من وظائف هذه الاغلفة .

-البروتينات الفوسفاتية **Phospho proteins** وهي بروتينات بسيطة متحدة مع حامض الفسفوريك وتوجد في الكازين الموجود في الحليب والفيتالين في صفار البيض .

ومن حيث الشكل تقسم البروتينات الى :-

أ- بروتينات ليفية **Fibrous proteins** وهي التي تظهر بشكل الياف لا

تذوب في الماء كما في بروتينات الصوف والشعر والحرير الطبيعي والفايبرين في الدم.

ب- بروتينات كروية **Globular protein** كما هو الحال في الانسولين (هورمون تنظيم السكر في الدم) والالبومين .

وتقسم البروتينات من حيث الوظيفة الحيوية الى : ١- الانزيمات : والمعروف منها حوالي ٢٠٠٠ وهي حفازات بايولوجية وتعمل على جميع التفاعلات الحيوية داخل الخلايا .

٢- الهورمونات : وهي منضمات كيميائية للافعال الحيوية المختلفة في الجسم.

٣- الاجسام المضادة : وهي بروتينات مناعية تقوم بتدمير الاجسام الغريبة والجراثيم الداخلة للجسم (وظيفتها دفاعية) .

٤- بروتينات التقلص : التي تدخل في تركيب الخلايا العضلية .

٥- البروتينات التركيبية : التي تدخل في تركيب الانسجة المختلفة .

٦- بروتينات الحماية الموجودة في الشعر والصوف والاظافر وغيرها .

خواص البروتينات
PROPERTIES OF PROTEINS

١- الخواص الفيزيائية

البروتينات تكون محاليل غروية كما انها لا تنفذ من الاغشية الخلوية نظراً لان اوزانها الجزيئية كبيرة .

ويمكن استخراج اوزانها الجزيئية بعدة طرق منها :

أ- من العناصر المكونة لها

فمثلاً الهيموكلوبين يحتوي على عنصر الحديد والذي يقدر بـ ٣٤ ٪

الوزن الذري للحديد = ٥٦

$$\frac{\text{الوزن الذري للحديد} \times ١٠٠}{\text{نسبة الحديد في الهيموكلوبين}} =$$

$$\text{حوالي } ١٧٫٠٠٠ = \frac{٥٦ \times ١٠٠}{٠ / ٣٤٠} =$$

وبما ان الهيموكلوبين يحتوي ٤ ذرات حديد

فإن الوزن الجزيئي = ١٧٠٠ × ٤ =٦٨٠٠٠ دالتون

٢- الخواص الكيميائية

البروتينات مواد امفوترية فهي تسلك كحوامض بالنسبة للقواعد وتسلك كقواعد بالنسبة للاحماض فهي ذات شحنة موجبة في الوسط الحامضي وسالبة في الوسط القاعدي .

٣- الذوبان : **Solubility**

لا تذوب في الكحول وتترسب في الاحماض المركزة والقواعد المركزة وعند نقطة التعادل الكهربائي **Isoelectric point** فإن درجة الذوبان تكون على أقلها وبسهولة تترسب وتتجلط بالحرارة .

٤- التفاعلات اللونية : **Colour Reaction**

اهم التفاعلات اللونية عدا التي ذكرت بالنسبة للاحماض الأمينية

تفاعل بايوريت **Biuret** تعطي لون بنفسجي وهو عام لجميع البروتينات .

تفاعل **Ninhydrin** للبروتينات والبيبتيدات والاحماض الامينية يعطي لون أزرق .

تغيير طبيعة البروتينات Denaturation

الدنترة هي تغيير الخصائص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية للبروتين عن حالته الطبيعية بفعل عوامل معينة دون تكسير الروابط الببتيدية ويتحول الى تركيب غير منظم ويتغير بنائه الدقيق ويفقد خواصه البايولوجية .

والعوامل التي تسبب الدنترة هي :

١- عوامل فيزيائية : مثل الحرارة المرتفعة والضغط العالي أشعة **X** - والاشعة فوق البنفسجية (**U V**) .

٢- عوامل كيميائية : كالاحماض القوية والقواعد القوية واملاح المعادن الثقيلة واليوريا .

التأثيرات المرافقة لعملية الدنترة :-

١- نقصان درجة ذوبان البروتين ولزوجته .

٢- زيادة تحلله المائي بالانزيمات .

٣- فقدان النشاط الحيوي (الانزيمات أو الهورمونات) .

٤- تكسر الاواصر الهيدروجينية .

٥- زيادة نشاط مجاميع (**SH-**) (**S-S-**) ومجاميع الهيدروكسيل الفينولية .

٦- فقدان خاصية التبلور .

استخلاص وتنقية البروتينات
ISOLATION AND PURIFICATION OF PROTEINS

البروتينات من المكونات الاساسية في خلايا حقيقية وبدائية النواة وفي الفايروسات، وهي نواتج الجينات في عملية تخليق البروتين . وتضم الخلايا الآناً من البروتينات المختلفة في خصائصها الكيميائية والفيزيائية والبايولوجية .

تستخلص البروتينات من الخلايا بعد تكسيرها بطرق مختلفة ثم تنقيتها وفصلها لدراسة خواصها المختلفة وربط علاقة التركيب مع الوظائف فهنالك بروتينات الاغشية الحيوية **Biomembranes** وبروتينات النواة وبروتينات العضيات السايتوبلازمية مثل الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء وغيرها من العضيات .

ويتم استخلاص البروتينات بطرق عديدة وابسطها الطحن بالرمل او بإستخدام المنظفات **Detergent** التي تعمل على تكسير الاواصر بين البروتين وبين الدهون او بينه وبين المعادن المتحدة معه .

ومن اكثر انواع المنظفات المستخدمة هو **Sodium Dodecyl (SDS) Sulfate** . او يتم بترسيب البروتينات بواسطة المذيبات بإزالة الماء منها ويتم ذلك باستخدام الاملاح مثل كبريتات الامونيوم او المذيبات العضوية مثل الاسيتون والايثانول او فصلها بطريقة الفصل الغشائي (الديلزة)**Dialysis** .

ويتم الكشف عن نقاوة البروتينات بطرق عديدة :

١- قابلية الذوبان ٢- الترحيل الكهربائي ٣- طرق الفصل الكروماتوكرافي مثل :

أ- الترشيح الهلامي **Gel Filtration** .

ب- الغربال الجزيئي **Molecular Sieve Chromatography**.

وتستعمل في هذه الحالة مواد السفادكس **Sephadex** او **Polyacry-lamide** او **Agarose**

وهذه ذات درجات مختلفة المسامية وبما أن البروتينات ذات اوزان جزيئية مختلفة لذا فهي تتحرك في العمود بسرع مختلفة .

الترحيل الكهربائي : Electrophoresis

بما ان البروتينات مزدوجة الشحنة فهي سالبة وموجبة وبحسب درجة الـ **PH** فالبروتينات ذات الشحنة السالبة تتحرك باتجاه القطب الموجب والموجبة تتحرك الى القطب السالب . ودرجة ترحيلها يعتمد على اوزانها الجزيئية وشحنتها الكهربائية بطريقة الهجرة الكهربائية **Electrophoresis** .

ومن ثم يتم توضيح اشرطة البروتينات المفصولة برشها بواسطة صبغات معينة لتحديد مواقعها ودراسة خواصها البيوكيميائية والبيوفيزيائية .

الفصل الثامن

التعبير الجيني

التعبير الجيني
GENE EXPRESSION

المبدأ الاساسي **Central dogma** للوراثة الجزيئية هو ان المعلومات الوراثية تتحرك وتنتقل بطريقين هما :

١- من الـ **DNA** الى الـ **DNA** بعملية التضاعف **Replication** والتي تنتقل من جيل الى جيل **Genotype** .

٢- من الـ **DNA** الى الـ **RNA** الى البروتين خلال التعبير المظهري في كائن حي **Phenotype** .

ان عملية نقل المعلومات الوراثية من الـ **DNA** الى الـ **RNA** الى البروتين

DNA to RNA to PROTEIN

او تخليق البروتين **Protein Synthesis** تتطلب :

١- عملية الاستنساخ **TRANSCRIPTION**

وهي عملية نقل المعلومات الوراثية من الـ **DNA** الى الـ **RNA**

٢- الترجمة **TRANSLATION**

وهي نقل المعلومات من الـ **RNA** الى البروتين .

وقد تكلمنا عن عمليات الاستنساخ للاحماض الرايبوزية الثلاثة في الفصل السابق يمكن الرجوع اليها .

تعتبر جزيء الـ **DNA** احدى المكونات الوراثية الاساسية للخلايا الحية حيث تحمل هذه الجزيئة معلومات بصور شفرة وراثية **Genetic Code** تنقل من خلية الى اخرى ومن كائن حي الى كائن حي اخر . ويتم ذلك عن طريق مادة وسيطة بين المادة الوراثية والبروتين والتي تعرف بالرنا الرسولي .

تجهز الطاقة في بناء البروتين مـن التحلل المائي لل (GTP) ووجود آيونات المغنيسيوم (++ MG) وتتضمن ثلاثة مراحل هي :

١- الابتداء Initiation وتشمل على :

أ- تنشيط الاحماض الامينية Activation Of Amino Acids .

ب- تكوين مركب معقد بين m-RNA ووحدات الرايبوسومات .

٢- الاستطالة Elongation وتتضمن على :

أ- تكوين سلسلة Poly peptide المبدئية (الاولية) .

ب- اطالة السلسلة Chain Elongation .

٣- الانهاء Termination وتشمل على :

أ- انهاء وتحرر السلسلة Poly peptide .

ب- تفكك معقد الرايبوسوم - الرنا الرسولي .

أولاً : مرحلة البدء

تساهم مجموعة من العناصر البروتينية والانزيمية الى جانب عناصر الترجمة في تكامل الدورة لتعطي في النهاية السلسلة البيبتيدية المطلوبة والتي لا تلبث ان تأخذ ابعادها الفراغية لتشكل البروتين المطلوب .

خلال عملية التنشيط تستخدم طاقة الـ ATP لغرض ضم او اتحاد جزيئات الـ t -RNA مع جزيئات الاحماض الامينية. حيث يوجد اكثر من عشرون نوع مختلف والاختلاف بينها ناتج من تكرار النكلوتيدات في الكودون المقابل Anti Codon .

يبدأ عـامل بروتينـي الموجود على سطـح الوحدة الصغـيرة **S-Subunit** في الرايبوسوم بربـط الرنا الناقل المحمل بالحامض الامـيني المنشط الميثيونـين - الفورميلي (**F-meth For my.tRNA**) في بداية النواة على الوحدة الصغيرة (**30S**) مقابلاً لـلرنا الرسولي كأول حـامض اميني في السلـسلة البيتـيدية ويتم ذلك بتـحفيز الانـزيم **Aminoacyl-RNA synthetase** (كـذلـك يـتم ذلـك فـي الميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء في حقيقية النواة) .

ثم ترتبط الوحـدة الكبيرة للرايبوسوم مـع الوحدة الصغيرة بفعل عـامل بروتيني آخر ويتشكل معقد الترجمة (**70S**) .

وتأتـي الطاقة الـلازمة لتشـكيل المعـقدين من الـتحلل لجـزئية **GTP** ثم تـبدأ الترجمة . لاحظ الشكل (   ) .

وبوجود عوامـل بروتينية للبـدء (١-٢-٣)**Inition Factors** ومن الجدير بالذكر فإن في حقيقية النواة تبدأ بالحامض الاميني المثيونين **Meth** غير الفورميلي.

ثانياً : الاطالة

تنقـل الاحماض الاميـنية المنـشطة الى المـكان (**A**) على سـطح الرايـبوسوم اما الموقع (**P**) فيكون مشغـولاً من قبل الرنا الناقل لحامض المثيونين الـفورميلي وبمساعد الشـفرة المقـابلـة **Anti Codon** تنقـل على **m-RNA** الـذي يحـمل الشـفرة المكملة وبـوجود طاقة **GTP** ترتبط مجمـوعة الامين للحامض القادم مـع مجموعة الكاربوكسـيل للحامض الاميني (المـثيونين) وبتشكل الرابطـة الببتيدية ينـفصل الرنا النـاقل مـن الموقع (**P**) ويـصبـح حراً والذي يـستطـيع ان يـعود محـملاً مـرة اخرى بالحامض الاميني الاخر وهكذا يدخل كودون جديد الى الرايبوسوم ويجذب رنا ناقل جديـد وعادة تكـون مجمـوعة الامين حـرة في الحـامض الاميـني الاول بيـنما تـكون

مجمـوعة الكاربـوكسيل حـرة في نهاية السلسلـة . وتحدث بوجود عـوامل بروتيـنية للاطالة **Elongation Factors (EF)** .

ثالثاً : الانتهاء

بعد عملية الترجمة على **m-RNA** (قـراءة المعلومات الوراثية المحمولة على الرنا الرسولـي المرتبط على الرايبوسـومات وبفعل **t-RNAs** تتشكل البـروتينات) بعدهـا تتوقف العـملية ثـم يحصل انفـصال للبروتـين المتكون المـبرمج وذلك بتـحلل الرابطة بين الحامض الاميني الآخيـر والـ **t-RNA** . وبوجود بروتينين التحرر (١-٢) **Release Factors** وبعد تحرر البروتين يتحـرك اما الى داخل السايتوبلازم حيث يستـعمل داخلياً فـي الخلية او يتحرك الـى الشبكة الاندوبلازمـية **ER** للافراز الخارجي .

ان عمليـة صناعة البروتـين تكاد تكون متـشابهة في جميـع الخلايا الحية الـبدائية وحقيقية النواة، ولكن العلاقات المكانية والزمانية تكون مختلفة :

ففي بدائية النواة فإن عمليتي النسخ والترجمة تحدثان في نفس المكان وفي نفس الوقت (لعدم وجود غشاء يفصل النواة) .

اما في حقيـقية النواة فالعمـليتين تكون منفصـلتين في الزمان والمكان . فـعملية الاستنساخ تحدث داخـل النواة اولاً وتحدث المعالجة ثم تهاجر الى الـسايتوبلازم الذي تحدث فيه عملية الترجمة (صناعة البروتين) .

أهمية البروتينات :-

أن اهم وظيفة للجيـنات هي السيطرة على تركيب البروتيـنات وهذه البروتينات قد تـكون بـروتيـنات تـركيـبيـة أو انزيمـات او اجسـام مضـادة **Antibodies** او

هورمونات وبـذلك فهي تسيطر عـلى تنظيم وضبـط مراحل النمو والتشـكل والحجم ووقت النـضج ومعدل الـتكاثر وآليـات الدفاع والمناعـة وثبات درجة الحـرارة والقدرة على التفكير الخ .

وبما ان الخـلية تحـتوي علـى مركبـات اخرى مثـل الكاربـوهيدرات والـليبـيدات وغيرها من المواد والتي تعتبر ذات أهمية حيوية بـالغة للخلية ولوظائفها فإن التركيب الحيوي لمثل هـذه المركبات يخضع كذلك لـلسيطرة الوراثية من خـلال فعل الانزيمات وان آلية التركيب الحيوي لهذه المركبات خاضع بصورة غير مباشرة للـ **DNA** .

الشفرة الوراثية : GENETIC CODE

يحـمل الـرنا الرسـولي الـشفرة الـوراثية مـن الدنـا لاختيـار التـتابع الـصحـيح للاحـماض الامـينيـة لصـناعة الـبروتـين . وتتـألف الشـفرة مـن تتابـع ثلاث قـواعد نتروجينية **Triplet Code** وبما انه هناك اربع قواعد فإن العدد الذي يحصل من الشفرات يبلغ ٦٤ شـفرة مختلفة (٣) وهذا العدد يفوق عدد الاحمـاض الامينية التي يبلغ عددها عشرون حامضاً أمينياً .

والشفرة الواحدة تخص حامضاً امينياً معينا دون غيره .

والجدول التالي يوضح الشفرات الثلاثية والاحماض الامينية الخاصة بها .

كلايسين	GCU	G CG	GG C	GGA
ثريونين	ACU	ACG	ACC	ACA
الأرجنين	CGU	CGG	CGC	CGA
الميثونين	–	–	البادئ	AUG
التايروسين			UAU	UAC
فينيل الانين			UUU	UUC

تنظيم صناعة البروتين
REGULATION OF PROTEIN - SYNTHESIS

تتغير كمية البروتينات الموجودة في الخلية وانواعها اثناء تطورها ونموها وكذلك استجابة للتغييرات في عملياتها الايضية ويتم هذا التغيير جزئياً بواسطة اما :

١- الحث (التحريض) **INDUCTION**

٢- الردع (الكبح) **REPRESSION**

والمنظم لآلية بناء البروتين كما يتم جزئياً ايضاً بواسطة التغير في معدلات تحطم البروتين في الخلية بفعل انزيمات التحلل للبروتينات .

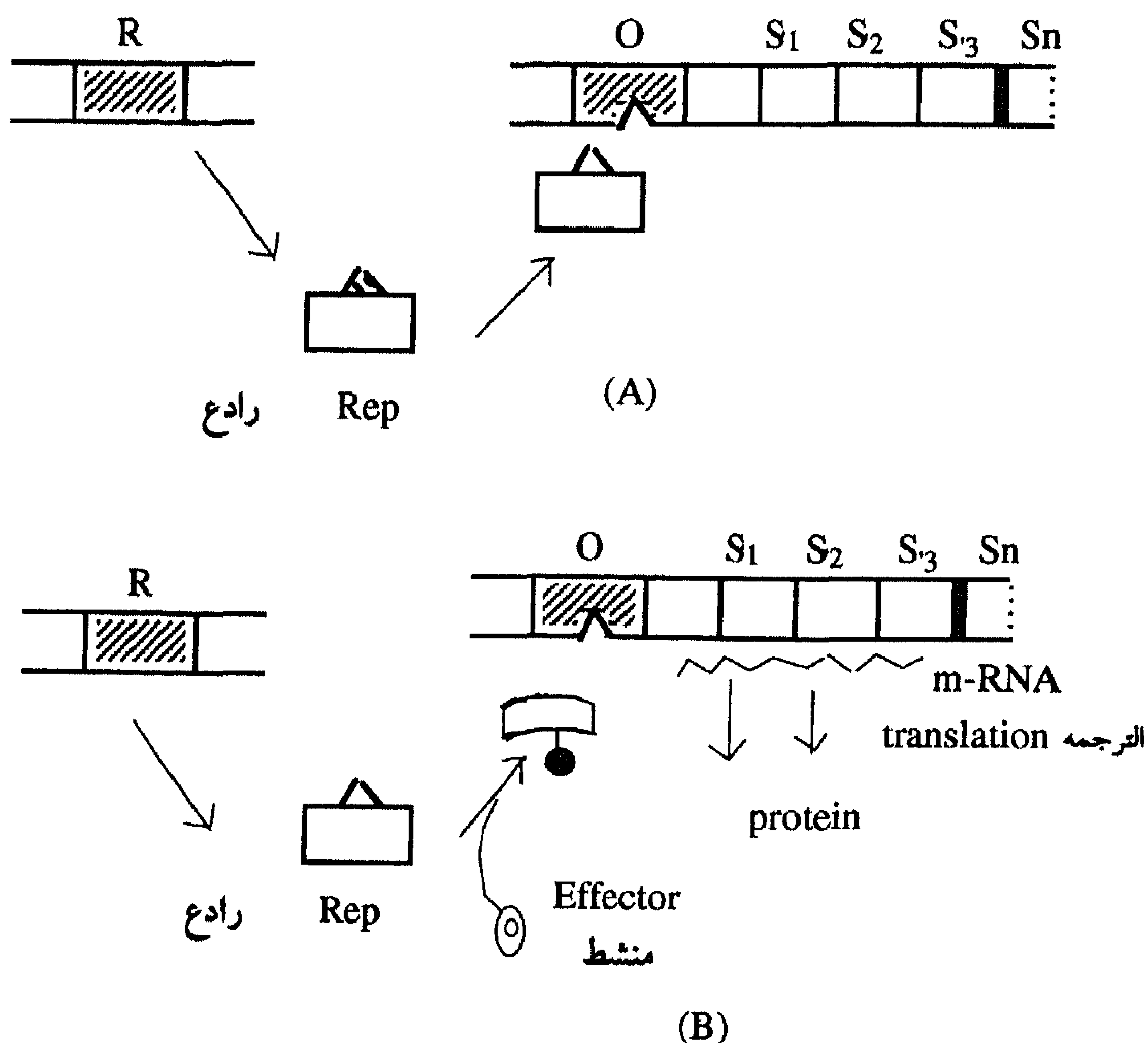
وهكذا توجد حالة من التوازن الديناميكي اذ يحدد كمية اي نوع معين من البروتين المعدلات النسبية لبنائه وتحطمه .

ويأتي الكثير من المعلومات الحالية عن تنظيم بناء البروتين من تجارب جاكوب ومونلد (**Jacob and Monod**) عام ١٩٦١ اللذين وضعا نموذج الاوبرون **Operon - Model** الذي يوضح الاساس الوراثي في الحث او الردع للانزيم في خلايا البكتيريا المعوية **E.Coli** حيث استخدما هذه البكتيريا لدراسة بناء الانزيمات الداخلة في عملية هدم سكر الحليب **Lactose** (**LAC OPERON**) .

تحتوي الخلايا الطبيعية التي تنمو بغياب اللاكتوز على كميات قليلة من انزيم اللاكتيز **Lactase** وهو انزيم محرض كما يفقد غلاف الخلية انزيم **Permease** وهو ضروري لنقل السكر الى الخلية .

ترتبط عدة اجزاء وظيفية من الـ**DNA** الخلية مع بعضها لتكوين وحدة الـ**Operon** لها القدرة على انتاج **m-RNA** اللازم لاستنساخ كل من اللاكتيز والبرميز **Permease** وفي الحالة الاعتيادية لا تؤدي هذه الجينات وظيفتها وذلك

بوجود بروتين خاص يعرف بالبروتين الرادع **Repressor Protein** ويوجد بالقرب من الموقع الموجة للأوبرون الشفرة اللازمة لبناء البروتين الرادع في موقع آخر من الـ **DNA** الجين المنظم **Regulator Gene** والشكل التالي (٨-١) يوضح عمل الاوبيرون :



R = الجين المنظم **Regulator Gene**

O = الجين المسير للعمل **Operator Gene**

S1 - Sn = الجينات التركيبية **Structural Genes**

REP = الرادع **Repressor**

EFF = المنشط (المحفز) **Effector**

ففي الحالة الاولى (A) ينجذب الرادع نوعياً ويكون فعال ويرتبط بالجين المسير للعمل وبذلك يمنع انزيم النسخ **RNA -Polymerase** وبذلك تتوقف عملية ظهور النسخ والانزيم في الوسط الخلوي ويردع تكون البروتين ويسمى بالرادع .

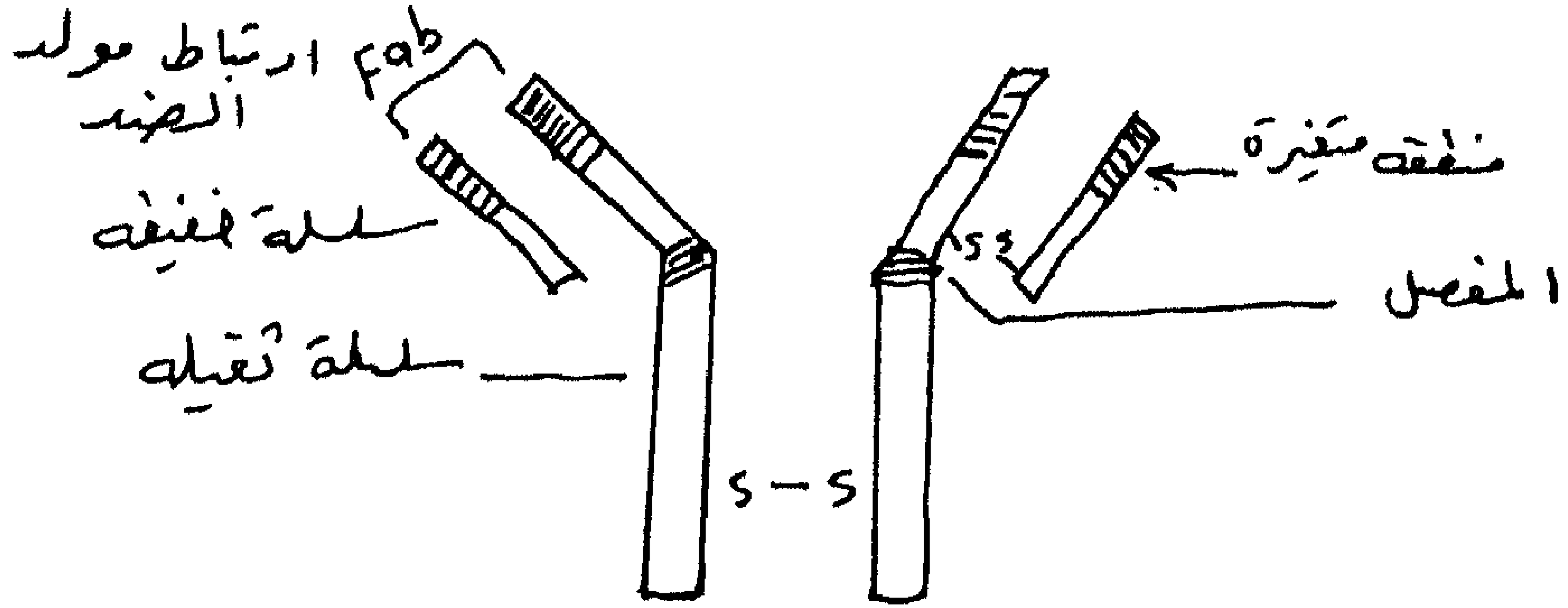
اما عندما يرتبط الرادع مع المنشط (المادة الايضية) فأنه يتحول الى شكل غير فعال وهنا يقوم انزيم المسير للعمل بتكوين انزيم النسخ الذي يصل الى جينات التركيب وتقوم بتكوين **m-RNA** ثم الترجمة لتكوين الانزيم (البروتين) وهذا يسمى بالتحريض .

اما في حقيقية النواة فهناك مجموعات تنظيمية عديدة تتحكم في تنظيم عمل الجينات مكانياً وزمانياً وهناك ادلة لاليات تنظيمية تعمل على مستوى الاستنساخ وهي هامة عند تمايز الخلايا .

التعبير الجيني في تركيب الاجسام المضادة
GENETIS CONTROL OF ANTIBODY SYNTHESIS

تعود الاجسام المضادة **Antibodies** الى نوع من البروتينات المعروفة بالكلوبيولينات المناعية **Immunoglobulins** وكل جسم مضاد يتكون من اربعة سلاسل بيبتيدية كل سلسلتين منهما متماثلتين يطلق عليهما السلسلتين الخفيفتين والسلسلتين الثقيلتين فالخفيفة تتكون من حوالي ٢٢٠ حامض اميني اما الثقيلة فتتكون من حوالي ٤٤٠حامض اميني .

وترتبط هذه السلاسل مع بعضها بواسطة روابط ثنائية الكبريت **(S-S)** حيث ترتبط سلسلة خفيفة مع سلسلة ثقيلة وترتبط السلسلتين الثقيلتين مع بعضهما ايضاً برابطة ثنائية الكبريت . كما في الشكل (٨-٢) .



وعلى نهاية الساق يوجد ما يعرف بالمنطقة التي ترتبط بمولد الضد **Antigen** ولكل سلسلة منطقة متغيرة تتغير فيها تكرار الاحماض الامينية حسب نوع مولد الضد ومنطقة ثابتة حيث يكون في تكرار الاحماض الامينية متشابه في جميع الاجسام المضادة .

تقسم البروتينات المناعية الى خمس انواع حسب تركيب السلسلة الثقيلة والوزن الجزيئي والخصائص الكيميائية ويطلق عليها **IgE , IgD , IgM , IgG , IgA** .

وقد تم باستخدام تقنية اعادة اتحاد الـ **DNA** من تشفير سلاسل الببتايد للاجسام المضادة من قطع الـ **DNA** الكروموسومية وتخلق كل سلسلة من الاجسام المضادة باستخدام المعلومات المخزونة في الجينات او قطع من الجين .

الفصل التاسع

الطفرات

الاساس الجزيئي

الطفــــرة
Mutation

وهي تغيير في المادة الوراثيه اي تغيير في عدد وتتابع النكليوتيدات . وقد يكون التغيير في عدد الكروموسومات او تغيير فـي تركيب الكروموسوم والذي يطلق عليها بالانحرافـات الكروموسوميـه . اما التغيير فـي الجين المفرد (تغيير الـ DNA) قد يكون التـغيير في زوج واحد من الـقواعد النيتروجـينيه باضافة زوج او بـنقصان زوج وتسمى بالطفـره النقطيه **Point Mutation** والتي عن طريقهـا تتولد مورثات (جينات) مقابلة (الاليلات) .

تعتبر الطفرات ظاهرة مهمه حيث انها تمـكن الكائنات الحيه من التطور والتكيف للتغييرات البيئيه .

تقسم الطفرات الى قسمين :

١- الطفرة التلقائية **Spontaneous Mutation**

وهي التـي تحدث دون معرفـة السبب وقـد تنتج مـن تغييـر في مسـتوى الايض نتيجة خطأ في تضاعف الدنا او نتيجة لوجود بعض المواد المطفرة في بيئة الكائن الحي وينتج التطفر في الدنا الجديد .

وقد تحدث في خلية بكتيريا واحدة من عدة ملايين من الخلايا .

٢- الطفرة المستحثة **Induced Mutation**

وهـي الـنـاتجـة من تـعـرض الـكـائـن الحـي الـى بـعـض المركـبـات المـطـفـرة **Mutagenic Agent** مثل الاشعاعات وبعض المواد الكيميائية التي تتفاعل مع المادة الوراثية الدنا (او الرنا في بعض الفـيروسـات) ومن الجديد بالذكر فإن الفرعين لا يختلفان الا في التكرار حيث تحدث الطفرات المستحثة بمعدل اكبر .

وقد تحـصل الـطفـرة في الخلايـا الجسـميـة **Somatic Cells** اثنـاء الدورة

الخلوية وهي اما متغلبة او متنحية فإذا كانت متغلبة فيحصل تغيير في النمط المظهري. اما اذا حدثت الطفرة في الخلايا التكاثرية **Germ Cells** والتي قد تحدث في اي مرحلة من مراحل تكاثر الكائن الحي والتي تنتقل من جيل الى جيل اخر اذا كانت متغلبة .

تقسم الكائنات الحية المطفرة **Mutants** الى ثلاثة اقسام :

١- السلالات المتطفرة ناقصة التغذية **Auxotrophic** وهي السلالات التي ليس لها القدرة على تخليق بعض المركبات الايضية الاساسية (مثال الاحماض الامينية او الفيتامينات او النكليوتيدات) والتي تخلق بشكل كامل في السلالات البرية .

٢- السلالات المتطفرة الحساسة للحرارة **Temperture Sensetive Mutants** وهي السلالات التي تستطيع ان تنمو جيداً تحت درجات حرارية معينة ولا تستطيع النمو تحت درجة حرارية اخرى وقد تكون حساسة للحرارة **Heat - Sensetive** او تكون حساسة للبرودة **Cold - Sensetive** حيث تتاثر بعض الانزيمات .

٣- السلالات الحساسة للكتم او الاخماد **Suppressor Sensetive Mutants** .وهي السلالات القادرة للنمو عندما يكون عامل وراثي ثانوي موجود **Asurppressor** ولكنها تفقد القابلية للنمو عند غياب هذا العامل .

الاساس الجزئي للطفرة
THE MOLECULAR BASIS OF MUTATION

ان حدوث الطفرة على المستوى الجزيئي يعني تغيير في تعاقب او تسلسل النكليوتيدات ضمن جزيئ الـ **DNA** كما اشرنا سابقاً وهذا التغيير من شأنه ان يحور المعلومات التي يحتويها الحامض النووي وبذلك يحصل تحوير في البروتين المبرمج مختلف من ناحية تسلسل الاحماض الامينية فقد يفقد وظيفته اذا كان انزيماً مثلاً .

لقد تمكن واطسن وكريك من وصف التركيب الحلزوني المزدوج للدنا واقترحا التضاعف نصف المحافظ غلى اساس القواعد النيتروجينية وانتقال هذه المعلومات من جيل الى اخر واقترحا ايضاً الطفرة التلقائية كما اوضحنا ان تركيب القواعد غير ثابت ويمكن ان تتحول الروابط الهيدروجينية من موقع الى موقع اخر للبيورينات والبريميدنات . وقد اطلق على هذه التذبذبات الكيمياوية بالانحرافات التوتومرية **Tautomeric SHifts** وهي نادرة الحدوث . والطفرات الناتجة عنها تتطلب الاستبدال **Substitution** للنكليوتيدات بعضها مع بعض وتسمى بالا' تقال **Transition** من شريط الى الشريط المتمم اوتحدث عملية استبدال بيورين حل بريميدين او العكس بالعكس بعملية يطلق عليها **Transversion** اي الاستبدال

او قد يحدث فقدان قاعدة نتروجينية **Deletion** او اضافة او ادخال **Inser-tion** قاعدة نتروجينية ويطلق على عمليتي النقصان والاضافة بالانحرافات الهيكلية **Frameshift Mutation** .

الطفرات الحادثة بفعل الاشعاعات

تقسم الاشعاعات الى نوعين حسب تأثيرها :

١- الاشعاعات المؤينة **Ionizing Radiation** مثل الاشعة **X** (السينية) واشعة δ والاشعاعات الصادرة من النظائر المشعة (α و β) وهي الاشعاعات التي لها طاقة كبيرة تستطيع اختراق الانسجة وتؤدي الى تأين المادة من خلال طاقتها التي تؤدي الى انطلاق الكترون من الجزيئة من مداره .

٢- الاشعة غير المؤينة

مثل الاشعة فوق البنفسجية (**U V**) وهذه الاشعة طاقتها قليلة بحيث تحدث تهيج (اثارة) وفي الجزيئات دون ان تؤدي الى التأين فالجزيئات التي يحدث فيها التأين او الاثارة تكون من الناحية الكيميائية اكثر فعالية من تلك الجزيئات التي هي بحالة مستقرة . ان ازدياد القدرة على التفاعل للجزيئات والموجودة في جزيء الدنا هو اساس التأثير المطفر للاشعة فوق البنفسجية والاشعاعات المؤينة .

من المعروف ان البيورينات والبريميدينات تمتص الاشعة فوق البنفسجية بدرجة كبيرة واقصى امتصاص يحدث عند طول موجي ٢٥٤ نانومتر . وبما انها اشعة ذات طاقة واطئة فإنها لا تدخل الا الخلايا في المناطق السطحية (الجلد مثلاً او العين) في الكائنات الحية عديدة الخلايا بينما تكون مطفرات قوية بالنسبة للكائنات وحيدة الخلية. ويتركز تأثير الاشعة فوق البنفسجية في مساعدتها على احداث انحرافات توتومرية في تراكيب القواعد النتروجينية ومن المعروف ان الثايمين يمتص بشكل كبير الاشعة عند طول موجي ٢٥٤ نانومتر ونتيج ذلك يصبح فعال جداً حيث يتحلل مائياً وتتحد ازواج من الثايمين تسمى **Thymine Dimer** وهذا ما يؤدي الى

الطفرة التي تسبب بواسطة هذه الاشعة (U V) . كما في الشكل (   )

ويحدث ذلك اما :

أ- تكوين تلف في الحلزون المزدوج حيث يتداخل عند تضاعفه .

ب- او تحدث تلف مؤقت بحيث ان الخلية لها القدرة على عملية اصلاح التلف في جزيء الـ DNA .

ويعتمد هذا على نوع الكائن الحي وعلى الظروف المستخدمة .

آليات اصلاح الدنا
DNA -Repair Mechanisms

تمتلك الخلية الانزيمات التي بمساعدتها تتمكن من اصلاح التلف التي تحدثها الاشعة فوق البنفسجية الا انها تعجز عن ذلك عندما يتم التعرض للاشعة لفترة طويلة حيث يؤدي ذلك الى استبدال قاعدة بإخرى في عدة مواقع من جزيء الـ DNA .

تمتلك الكائنات الحية من الفيروسات البكتيرية حتى الانسان على آليات اصلاح التلف . فمثلاً وجد في البكتيريا المعوية ان لها القدرة على اصلاح تلف الـ DNA بثلاثة طرق هي :-

١- التفاعلات الضوئية **Photoreactivation**

وتتطلب فعل انزيمي حيث تعمل هذه الانزيمات على فصل الثايمين المبلمر الثنائي بدون ازالة اي من النكليوتيدات . يرتبط الانزيم في الظلام ويحفز على انشطار الجزيئات بواسطة الضوء وخاصة الازرق .

لذلك ففي التجارب عند استعمال الاشعة فوق البنفسجية كمطفر يجب ان يتم ذلك بالظلام . ومن الجدير بالذكر فإن الانزيم فعال في حالة المبلمر الثنائي للسايتوسين كذلك **Cytosine - Dimer** .

٢- الاصلاح بواسطة الحذف : **Excision Repair**

تتطلب هذه سلسلة من الانزيمات التي تحفز عدد من الخطوات فيها يتم ازالة **Thymine Dimer** من جزيء الـ **DNA** ويتكون بدلاً من ذلك قطع جديدة.

وتحدث هذه العملية في الظلام وبوجود الضوء الازرق .

ومن الانزيمات العاملة بهذه الطريقة لاصلاح التلف هي :

أ- انزيم **Endonuclease** التي تعمل على تقطيع اواصر الفوسفات ثنائي الاستر في السكر والفوسفات .

ب- انزيم **Polymerase I** الذي له فعالية محللة بالاتجاه (5 --> 3) (**Exonuclease**)

جـ- انزيم الربط **DNA - Ligase** الذي يقوم بربط الاجزاء النهائية بعد عملية الحذف .

٣- اصلاح التلف في نهاية التضاعف واعادة التشكل الوراثي **Postreplication -Recombination Repair** التفاصيل بخصوص هذه العملية غير معروف الا انه يتطلب عملية تضاعف ثم اعادة التشكيل الوراثي .

في الاونة الاخيرة اكتشف انزيم في البكتيريا المعوية **E . Coli** يطلق عليها اسم يوراسيل - دنا كلايوكسيليز **Uracil -DNA - Glycosylase** الذي يعمل بكفاءة لازالة اليوراسيل من جزيء الدنا حيث يقوم بتكسير الرابطة بين القاعدة والسكر ومنها جاء الاسم كلايكوسيليز .

وقد وجد ان البكتيريا الفاقدة لهذا الانزيم تكون اكثر حساسية للعوامل المزيلة للأمين **Deaminating Agents** مثل حامض النتروز **Nitrous Acid**.

المطفرات الكيمياوية
CHEMICAL MUTAGENS

توجد العديد من المواد الكيمياوية التي لها تأثيرات مطفرة وقد تكون هذه التأثيرات خفيفة او شديدة على المستوى الجزئي .

تقسم المطفرات الكيمياوية الى قسمين :

١- المطفرات التي لها تأثيرات مطفرة عند عملية التضاعف وغير التضاعف للدنا مثل مركبات الالكلة **Alkylating Agents** وحامض النتروز **Nitrous Acid** .

٢- المركبات التي تعمل كمطفرات فقط عند مرحلة التضاعف للدنا مثل صبغات الاكردين **Acridine Dyes** ومركبات شبيهة القواعد النتروجينية مثل **5 - Bromouracil 2- Aminopurine** التي ترتبط مع الدنا وتؤدي الى حصول خطأ في تركيبه ومن الجدير بالذكر فإن تركيز المطفر الكيمياوي وفترة التعرض له لها تأثيرات في النتائج المتحصل عليها قد تكون قاتلة للخلايا .

حامض النتروز : **Nitrous Acid**

رمزه **HNO2** وهو من المطفرات القوية عند تضاعف الدنا او في المراحل الآخرى غير المتضاعفة .

يعمل هذا الحامض على ازالة مجموعة الامين **NH2** من القاعدة النتروجينية مثل الادنين والسايتوسين والكوانين التي تحتوي على هذه المجاميع حيث تتحول مجموعة الامين الى مجاميع كيتونية وبالتالي يؤثر على الروابط الهيدروجينية بين هذه القواعد فالادنين يتحول الى مركب يطلق عليه الهيبوزانثين **Hypoxanthine** الذي يتزاوج بشكل قوي مع السايتوسين بدلاً من الثايمين والسايتوسين يتحول الى اليوراسيل الذي يتحد مع الأدنين بدلاً من الكوانين .

اما الكوانين فأنه يتحول الى مركب يسمى زانثين **Xanthine** الذي يتزاوج مع السايتوسين وهذا يعني ان **GC** $\rightleftarrows$ **AT** وبالعكس اي تطفر ثنائي الاتجاه.

مركبات الالكلة :

تضم هذه مجموعة من المركبات لها فعالية عالية على النكليوتيدات حيث تدخل هذه المركبات في الدنا بدلاً من القواعد النتروجينية ومن هذه المواد غاز الخردل والايبوكسيدات **Epoxides** ومثيل وايثايل سلفونات (**MMS**) و (**EMS**) وغيرها .

تعمل هذه المركبات على حدوث طفرات الاستبدال والتحول والتغير الهيكلي .

الهيدروكسيل آمين : Hydroxylamine

ورمزه **NH2OH** وهو مادة مطفرة نوعية ومحددة اذ ان تأثيره وفعاليته تتم على السايتوسين وتتحول **GC**$\longrightarrow$**AT** اي احادي الاتجاه وبسبب نوعيته فإنه اصبح مفيداً لتعيين الطفرات الانتقالية **Transition Mutations** .

اصباغ الاكردين :

وتضم الاكردين البرتقالي والبروفلافين وغيرها لها فاعلية كبيرة لاحداث طفرات بإضافة او حذف عدد من القواعد النتروجينية .

المركبات شبيهة القواعد Base Analogs

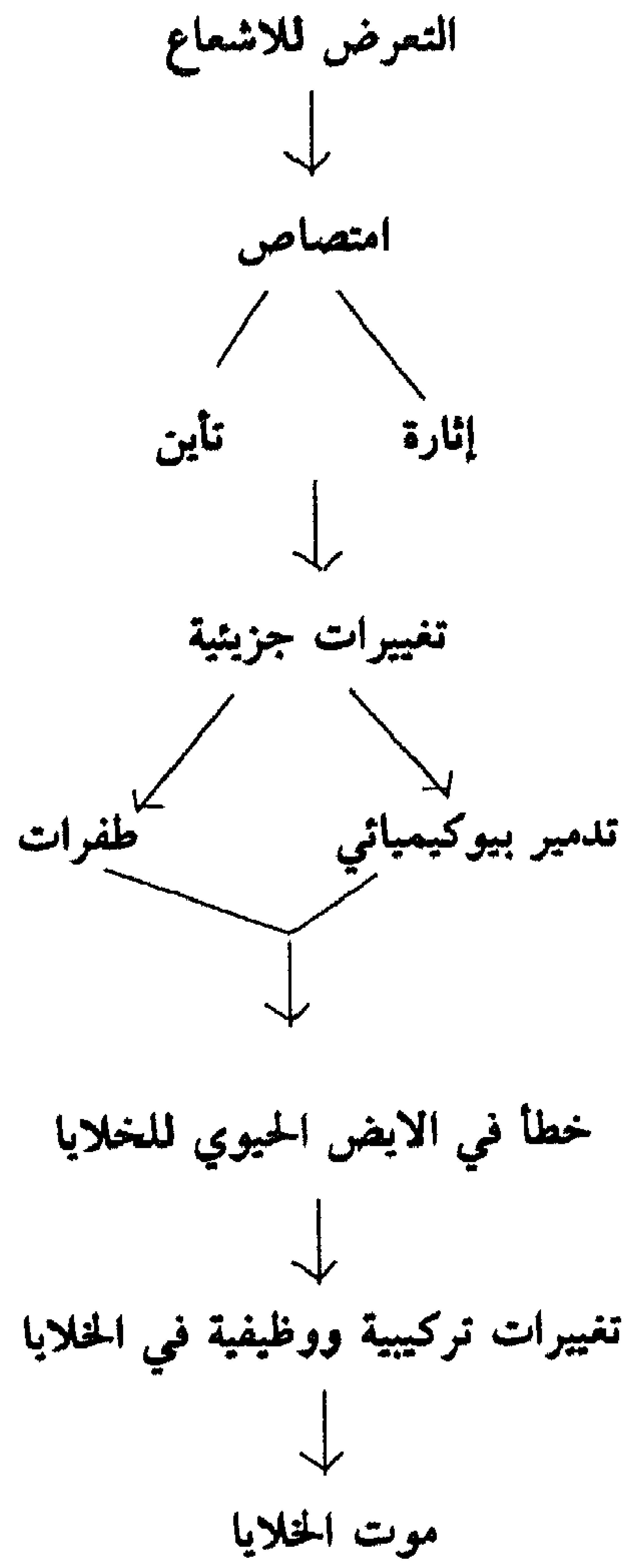
وتضم المركبين **5- Bromouracil , 2-Aminopurine** وهي مركبات تشبه القواعد النتروجينية وتحل محلها في تركيب الدنا اثناء عملية التضاعف

وبذلك تتكون أخطاء تؤدي الى حدوث الطفرة فال**5-BROMOURACIL** يشبه الـثايمين ويتزاوج بدلاً مـنه مع الادنين ويحدث طفـرة ثنائية الاتجاه مـثل حامض النتـروز اما المركب الـثاني **2-Aminopurine** فإنـه يعمل عـلى الدنا كـما هو الحال للمركـب الاول ولكن على البيورينات الكوانين والسايتوسين وبنفس الطريقة .

وبالرغم مـن أن نتائج معظـم المطفرات عشوائي وحـصيلتها غـير معروف الا ان استعمال المـطفرات في تحوير المادة الوراثيـة للاحياء المجهرية ذات الاهميـة الاقتصادية والتي تطبق في مجـال التكنولوجيا الحيوية كان ولا يزال واحد مـن الاساليب الشائعة نظراً لبساطة تركيب المادة الوراثية لها وسهول احداث تغيرات فيها .

حيث تركز الابحاث والدراسات الحديثة على استنباط كائنات مطفرة لها انتاجية عالية لكثير من المواد ذات الاهمية للانسان كالـتخمرات وتتطلب هذه العملية اساليب عزل وطرق تشخـيص للمتطفرات المفـيدة وتجنب الخطرة منها وهـناك طرق عديدة لا يتسع مجال الكتاب لذكرها في كتب الميكروبايولوجي الصناعي .

والشكل المخطط التالي يوضح تأثير الاشعاعات على الانظمة البايولوجية :


التعرض للاشعاع
امتصاص
إثارة
تأين
تغييرات جزيئية
تدمير بيوكيميائي
طفرات
خطأ في الايض الحيوي للخلايا
تغييرات تركيبية ووظيفية في الخلايا
موت الخلايا

الفصل العاشر

المادة الوراثية خارج النواة

المادة الوراثية خارج النواة
EXTRACHROMOSOMAL GENETIC MATERIAL

من الواضح ان الحامض النووي DNA موجود في كلاً من المثيوكوندريا والبلاستيدات الخضراء والتي تستخدم كحوامل للمادة الوراثية خارج الكروموسومات.

١- الميتوكوندريا MITOCHONDERIA

تمتلك جميع الخلايا الحية ما عدا البكتيريا والطحالب الخضراء - المزرقة والكريات الحمر البالغة على الميثوكوندريا وهي عضيات سايتوبلازمية صغيرة تتضاعف ذاتياً تتركب داخلياً من اغشية معقدة وهي تمثل مركز للتنفس الهوائي الخلوي . شكلها غير ثابت فقد تكون متطاولة او قضيبية طولها حوالي ٥ ميكرون وقطرها ٠,٥ ميكرون، وتختلف بالعدد فقد تحتوي الخلية عضية واحدة او عد الآف.

تحتوي الميثوكوندريا على الحامض النووي DNA الخاص بها الذي يسمى (mt-DNA) مكوناته من القواعد تختلف من كلاً من الـDNA النووي ومن الـ DNA في البلاستيدات الخضراء . ويتضاعف الـDNA في الميثوكوندريا دون الاعتماد على الـDNA النووي من خلال فعل الانزيم المبلمر DNA-Polymerase الذي يختلف عن الانزيم المبلمر في النواة .

في العديد من الانسجة الحيوانيةعديدة الخلايا مثل خلايا الكبد والخلايا المولدة للالياف يكون mt - DNA بشكل اشرطة مزدوجة حلقية يشبه الـ DNA البكتيري وزنه الجزيئي يبلغ (٦×١٠) . طوله حوالي ٥ ميكرون ويتكون من

١٤٠٠٠ زوج قاعدة ، كما دلت الابحاث ان الشكل الحلقي لـلـ**mt - DNA** موجود في الخلايا البشرية .

العديد من بروتينات هذه العضية يتم تخليقها بداخلها باستخدام **mt-DNA** كقالب (مرصاف) لـلـ**mt - RNA** ولكن بعض البروتينات التي تحتاجها الميتوكوندريا مثل السايتوكروم (**C**) يتم تصنيعها خارج هذه العضية في الخلية كما تحتوي على الرايبوسومات الخاصة بتصنيع البروتينات، وهي تشابه ما موجود في البكتيريا لذلك فإن بعض المضادات الحياتية مثل **Chloramphenicol** الذي يثبط تخليق البروتينات في بدائية النواة فإنه يثبط ايضاً تخليق البروتينات في الميتوكوندريا وفي الخلايا حقيقية النواة مثل الخمائر فإن **mt-DNA** له خصائص مختلفة عن **DNA** النواة في الكثافة والنسبة من القواعد النتروجينية **GC** الى **AT** .

البلاستيات الخضراء : CHLOROPLASTS

تنشأ البلاستيدات الخضراء من البلاستيدات الاولية **Proplastid** التي لها القدرة على الانقسام وزيادة العدد وتقع تحت سيطرة الـ **DNA** النووي .

ولقد لوحظ في بعض الدراسات ان **DNA** في البلاستيدات الخضراء العائدة للطحلب **Acetabularia** يكون ذو لف فائق والوزن الجزيئي لل (**cp -DNA**) في البلاستيدات الخضراء في النباتات العليا يبلغ اكثر من ٨٥ × ١٠ ^٦^ وبالمقابل فإن ال **cp - DNA** في الطحلب احادي الخلية الكلاميدوموناس يبلغ ١٠ × ١٠ ^٩^ بينما يبلغ في اليوغلينا حوالي ٩٠٢× ١٠ ^٧^ وهو اصغر من **DNA** البكتيريا المعوية وبشكل عام فإن جميع الدراسات تشير الى ان **cp -DNA** يكون مغلق وحلقي ومن جزيئيات مزدوجة ومن الواضح ان **cp - DNA** يختلف في

مكونات النكليوتيدات عن DNA النواة حيث وجد ان الاشعة الفوق بنفسجية تعمل على تدمير cp - DNA بينما لا يحدث هذا في DNA النواة كما وجد ان البلاستيدات تحتوي على انزيم البلمرة الخاص بها (cp - Polymerase) يستطيع ان يتضاعف وانه من نوع النصف محافظ ويحدث التضاعف في فترة زمنية مختلفة عن الفترة التي يحدث فيها تضاعف DNA النواة .

تحتوي البلاستيدات الخضراء على الحامض النووي الرايبوزي وعلى الرايبوسومات وهي جسيمات اصغر من رايبوسومات السايتوبلازم في الحجم وهي تشبه رايبوسومات البكتيريا كما ان لها نفس معدل الترسيب وانها تثبط بواسطة ال Chloramphenicol .

التشكل الوراثي في البكتيريا
RECOMBINATION IN BACTERIA

تخزن المعلومات الوراثية في البكتيريا في :

١- كروموسوم رئيسي مفرد Single Main Chromosome

٢- في كروموسوم صغير Minichromosome التي يطلق عليها بالـ Episomes والبلازميدات Plasmids .

تختلف البلازميدات اختلافاً كبيراً من حيث الحجم فهي تتراوح بين بلازميد حامل لثلاث جينات الى بلازميد يحمل عد مئات من الجينات . فالبكتيريا الحقيقية تؤوي حوالي ١١ بلازميد مختلف بالاضافة الى الكروموسوم الرئيسي .

هناك ثلاث عمليات يتم بواسطتها نقل المادة الوراثية من خلية بكتيريا الى اخرى بحيث تحصل عملية تحول (التشكيل الوراثي)Recombination وهي :-

١- Transformation التحول الوراثي .

وهي عملية نقل المادة الوراثية DNA من خلية (**donor** معطي) بكتيريا الى اخرى (المستقبل) **Recipient** .

٢- **Transduction** التحول الوراثي المنقول .

وهي عملية نقل المادة الوراثية من خلية (المعطي) الى خلية اخرى (المستقبل) بواسطة حملها عن طريق العاثيات **Bacteriophages** .

٣- **Conjugation** الاقتران .

وهي عملية نقل المادة الوراثية من خلية (المعطي) (ذكرية **male**) الى اخرى (مستقبلة) (انثى **femal**) خلال شعيرات التكاثر **Sex Pili** او انبوب التزاوج **Conjugation - tube** .

البلازميدات PLASMIDS

تحمل المادة الوراثية في البكتيريا في كروموسوم رئيسي واحد وهناك العديد من الحالات التي توجد فيها مادة وراثية خارج الكروموسومات ، واحد او اكثر يطلق عليها اسم الكروموسوم الصغير **Mini Chromosome** او البلازميد **Plasmid** وهو بعكس **Episome** التي هي قطع من الـ **DNA** مدمجة مع الكروموسوم الرئيسي اما البلازميد فيوجد خارج الكروموسوم في السايتوبلازم .

ولقد ازدادت اهمية البلازميدات في العقدين الاخيرين من هذا القرن وذلك لاهميتها العملية في مجالين هما :

١- انتشار مقاومة العديد من المضادات الحياتية والعقاقير في البكتيريا المرضية .

٢- عدم ثبوت **Instability** الاحياء المجهرية الصناعية الهامة، فمثلاً البكتيريا **Streptococcus lactis** المستخدمة في صناعة الجبن لوحظ فيها عدد من البلازميدات التي تحمل جينات خاصة لصناعة الانزيمات المهمة في عمليات التخمر عند صناعة الاجبان .

توجد ثلاثة انواع رئيسية من البلازميدات والتي درست بشكل معمق وهي :

١- بلازميد عامل الخصوبة Fertility - Factor و F- F- Plasmids

فقد وجد في البكتيريا المعوية E . Coli عامل الخصوبة الذي يقوم بتحويل البكتيريا F (الانثوية) وهي البكتيريا المستلمة حيث تكتسب صفات جديدة نتيجة هذا الانتقال، اما البكتيريا المانحة (Donor) +Fe (الذكرية) لهذه الصفات فيطلق عليها البكتيريا ذات التردد العالي في حدوث هذا التحول High Frequency Recombination (HFr) ويستفاد من هذه الظاهرة في رسم الخرائط الكروموسومية Chromosome Map في البكتيريا وهذا النوع يحصل في البكتيريا المقترنة Conjugative . اما النوع الاخر من البلازميد فهو الذي يوجد في البكتيريا غير المقترنة Non - Conjugative حيث لا يحصل نقل الدنا DNA بالاقتران بعبارة اخرى ان الانتقال عند حصول الاقتران لعامل (F) يحدث من (+F) الى (-F) التي تتحول الى (+F) وتحصل الخلايا على عامل الخصوبة .

وفي بعض البلازميدات يطلق على المادة الوراثية اسم Episome مثل عامل الخصوبة .

وتتضاعف ال Episome بطريقتين اما :

١- كمادة وراثية مندمجة مع كروموسوم الخلية المضيف Host .او

٢- تبقى بشكل مستقل وغير معتمدة على تضاعف كروموسوم الخلية المضيف (Host cell.) تستطيع البكتيريا الحاملة لعامل الخصوبة تخليق نوع خاص من البروتين لوجود الجين الخاص بذلك لتكوين الاهداب الجنسية Sex - Pili التي تساعد في التصاق البكتيريا هذه مع خلية انثوية ويتم انتقال الـ DNA اليها .

٢- بلازميدات مقاومة المضادات الحياتية

Antibiotics Resistance Plasmids

او ما يطلق عليها عوامل (R) **R-Factors** وهي بلازميدات تحمل جينات مقاومة لكثير من المواد الكيميائية التي تتضمن العقاقير الطبية التي تحارب الاصابات المرضية ومن هذه العقاقير : كلورامفينيكول - البنسلين - تتراسايكلين مركبات السلفا **Sulfonamides** وغيرها من المضادات البكتيرية .

والعوامل (R) تتكون من جزئين هما :

عامل نقل المقاومة **Resistance Transfer Factor** (RTF)

وهو المسؤول عن عمليات النقل ومقاومة المضاد الحيوي **Tetracycline** .

والجزء الثاني هو **r -Factor** والذي يتضمن مقاومة جميع المضادات الحيوية الاخرى .

ويضم كثير من البكتيريا مثل **Shigella** و **Escherichia** و **Salmonella** هذه البلازميدات التي تحمل جينات لها القدرة على تخليق بعض الانزيمات التي تقوم بتعطيل فعل المضادات الحياتية والتي تنشأ عنها ضروب تسبب مشاكل للانسان في علاج الامراض .

اذ وجد ان جينات المقاومة يمكنها الهجرة من وحدة بلازميد الى اخرى ولها القدرة على القفز التي تسمى بجينيات القافزة **Transposons** من البلازميد الى الكروموسوم وتتميز هذه الجينات بعدم قدرتها على التكرار ذاتياً الا اذا ارتبطت مع البلازميد او الكروموسوم .

٣- بلازميدات الكوليسين **Colicins - Plasmids** أو ما تسمى بـ **Colicinogenic Factors** (col - factor) وهي عبارة عن وحدات وراثية مكونه من الـ **DNA** تحمل وحدات لانتاج الـ **Colicins** وهي عبارة عن بروتينات تعمل على قتل البكتيريا المعوية الحساسة .

كما توجد انواع تـعمل على تخليق مواد تـعرف بالـ **Bacteriocins** وهي مواد سامة للخلايا البكـتيرية التي تكونها ويتركز تأثيرها على الاغـشية السايتوبلازمية او على الرايبوسومات .

ومثال ذلك بلازمـيد بكتيريا الـ **Vibrio** تخلـق **Vibriocins** تعمل هذه على قـتل الخلايا الحسـاسة لـ **Vibrio cholerae** ومن الملاحـظ ان البكتـيريا الـتي تمـلـك هـذا النـوع مـن الـبلازمـيدات لا تـنـتـج كـمـيات كـبيـرة مـن الـ **Bacteriocins** الا اذا عوملت ببعض المركبات المسببة للطفرات

ويستفاد من الـ **Bacteriocin** في التمييز بين سلالات نفس النوع عند تشخيص الحالات المرضية .

يوجد انواع عديـدة من الكولسينات كل منـها له القدرة على القتـل ومن اهمها **Colicin (K)** الذي يثبط تضاعـف الـ **DNA** واستنـساخ الـ **RNA** ويثـبط تخليق البروتينات .

٤- بلازميد تاي **Ti - Plasmid**

وهو بلازمـيد محفز لـلسرطان فـي النباتات ذوات الـفلقتين مـثل عباد الـشمس والطماطـم والتبغ والجزر حيـث انه يحمل **DNA** الذي يغـير الخلية الاعتـيادية الى خـليـة سرطـانيـة **Tumor cell** الذي يـعـرف بالمحـفز لـلتـسرطـن **Tumor Inducing Plasmid** ويكتب اختصاراً بالـ **(Ti)** .

ويقترن هـذا النمو السرطانـي عند اصابة النبـات بواسطة بكتيـريا تعرف بالـ **Agarobacterium lumcfaciens** حيـث تعمل على تحفيز الاصابة السرطانيـة مكوناً نمواً منتفـخ وهذا المرض هام من الناحيـة الاقتصادية خاصة بالـنسبة للمـحاصيل الحـقلية والذي يـتسبب عـن دخول البكـتيريا للـنبات عن طـريق جروح سطحية ومن ثم تتـحد قطع من الـ **DNA** البلازميد التي تحمله البـكتيريا مع قطع الـ **DNA** للخلايا النباتية .

ويحمل هذا البلازميد جينات تشفر (تحمل شفرة) لانزيمات تعمل على تكوين النمو السرطاني المستمر وغير المسيطر عليه .

تكمن أهمية البلازميدات بكونها ناقلات للجين التي تستخدم في الهندسة الوراثية **Genetic Ingeneering** .

ان اهمية البلازميدات في الهندسة الوراثية هو استعمالها كناقلات للجين وسيأتي الكلام عنها لاحقاً .

كذلك تستخدم العاثيات **Phages** (ملتقمات البكتيريا) كناقلات للجين.

الأبيسومات : EPISOMES

وهي عبارة عن عناصر وراثية في الخلية وهي غير البلازميدات ويتم تضاعفها بطريقتين :-

١- اما انها تسلك كجزء مكمل للكروموسوم الرئيسي في الخلية المضيفة .

٢- او انها تسلك كعناصر وراثية مستقلة عن الكروموسوم الرئيسي للخلية المضيفة .

العاثيات (ملتقمات البكتيريا) BACTERIOPHAGES

لا يوجد تركيب مثالي للفايروسات ولكن توجد عدد من التحورات في التركيب الاساسي .

وبشكل عام فإن مصطلح فايروس يعني غلاف خارجي بروتيني غير وراثي وفي اللب توجد المادة الوراثية وهي تكون عادة مادة الـ **DNA** وفي بعض الاحيان الـ **RNA** . ومن احسن انواع الفايروسات المعروفة التركيب هي الانواع المسماة **T - Phages** (مثل **T2, T4**) والتي تصيب البكتيريا المعوية **E.coli** . يتكون

جسم العاثي (ملتقمات البكتيريا) T بشكل عام من جزئين هما الراس **head** والذنب **tail** .

الرأس يتكون من غلاف بروتيني متطاول هرمي الشكل ذو تركيب سداسي الجوانب قطره ٠,٠٦٥ ميكرون وطوله حوالي ٠,١ ميكرون يحتوي على المادة الوراثية **DNA** بطول حوالي ٦٨ ميكرون .

أما الذنب فيكون اسطواني مجوف محاط بغلاف حلزوني من ٢٤ حلقة .

الصفيحة **Plate** توجد في اسفل الذنب وتحتوي انزيمات حالة لجدار البكتيريا.

الاشواك والليفات وعددها ست لكل منها تتصل بالصفيحة .

لاحظ الشكل (١٠-١)

اما العاثيات الاخرى فتبدو مختلفة من الناحية المورفولوجية على سبيل المثال العاثي ١٧٤× ٠ الذي يكون بشكل عنقود مكون من ١٢ تحت وحدات **Subparticles** كروية الشكل متماثلة .

وبشكل عام يوجد نوعين من العاثيات حسب دورة تضاعفها (الحياة) - **life styles** هي : نقل بواسطة الفاجات **Transduction**

الفاجات المميتة (الخطرة) **1-Virulent Phages**

وفيها يتم بعد الاصابة تحلل لخلية المضيف وتتحرر عاثيات جديدة وتكون جاهزة لاصابة خلايا جديدة. **Generalized Transduction** (الخاملة او المعتدلة) . **2-Temperate Phages**

وهي التي تصيب الخلايا ونادراً ما تحلل خلايا المضيف .

(كما في العاثي لامدا الذي يصيب الـ **E.coli**) فهي تسلك **lytic pathway**.

أ- دورة الحياة التحلل **lytic cycle** وفيها يتم تضاعف وتكاثر الفايروس ثم تحلل خلايا المضيف مثل النوع الاول **Virulent Phages** . او

ب- انها تسلك دورة حياة اخرى **Lysogenic pathway** (اندماج) وفيها يتم اتحاد الكروموسوم مع كروموسوم الخلية المضيف ويتضاعف كما يتضاعف كروموسوم الخلية المضيف. ويطلق عليه بالـ**Specialized Transduction** لاحظ الشكل (١٠-٢) التحول المنقول الخاص ففي الحالة الاولى يتضاعف ال **DNA** للعاثي عدة مرات داخل خلية الكتيريا .

ومن ثم تتكون اغطية بروتينية مكونة (٥٠ -٢٠٠) عاثي جديد **New Bacteriophage** وبعد فترة قصيرة تتراوح بين (١٣-٢٢ دقيقة) كما **T2**, **T1** ويتم افراز انزيم (**Lysozyme**) الذي يعمل على تحلل البكتيريا وتتحرر كعاثيات بالغة جديدة .

يمكن اجمال خطوات اصابة الفاج للبكتيريا بما يلي : -

١- التصاق العاثي من الذيل على مواقع الاستسلام لجدار الخلية البكتيرية.

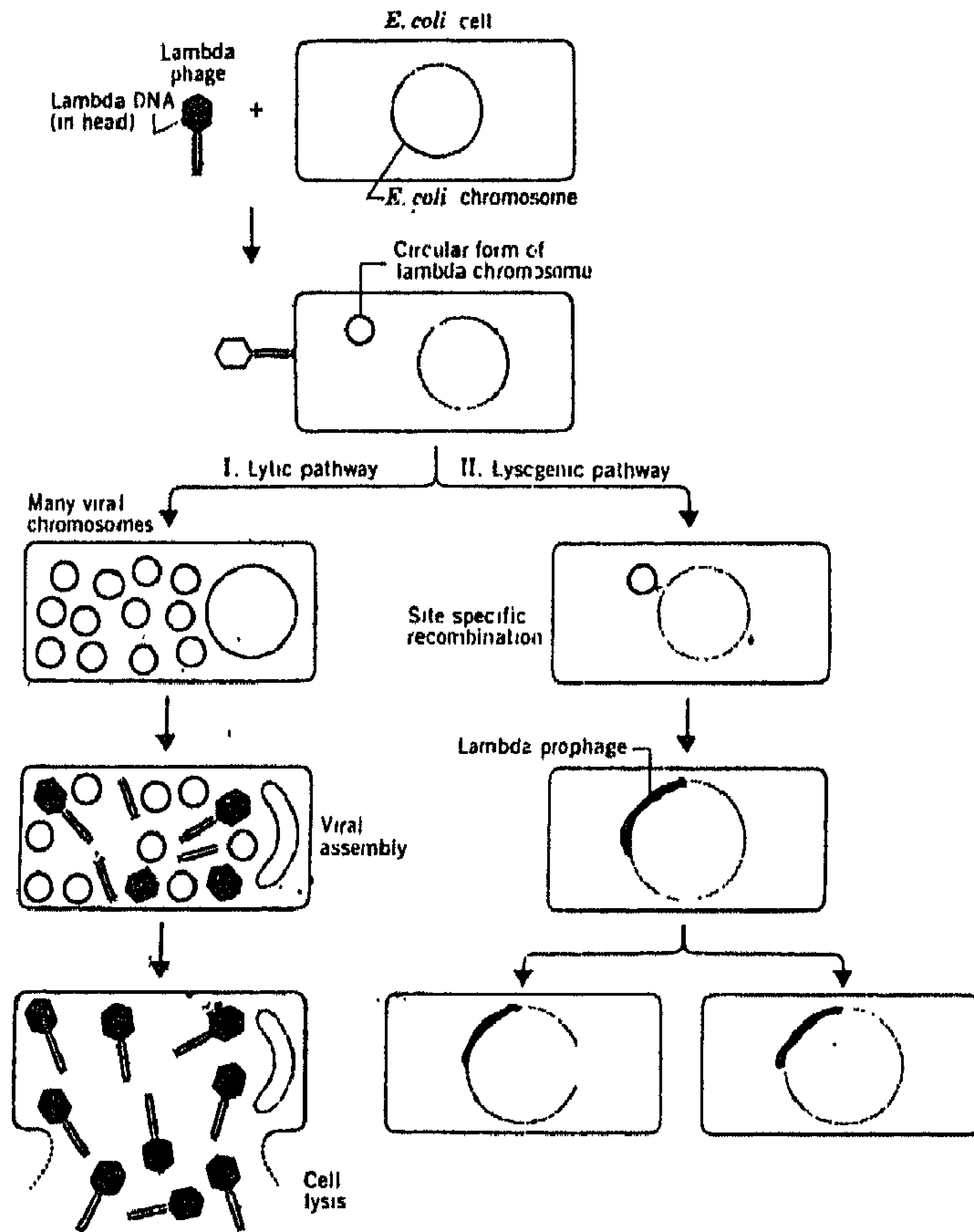
٢- حقن **Injection** الـ**DNA** للعاثي في البكتيريا .

٣- حصول تخليق جديد للـ **DNA** وبروتينات الغلاف .

٤- تجمع مادة الـ **DNA** الفاج داخل اغلفة بروتينية جديدة .

٥- تحلل خلية المضيف **Lysis** وتحرر عدة مئات من جزيئات الفاج .

وهذه الخطوات تحدث في الـ **Virulent Phages** كما في الفاج **P1** الذي يصيب **E.coli** والفاج **P22** الذي يصيب ال **Salmonella** والفاجات **PBS1** والـ **SP10** الذي يصيب **B.Subtilis** تستعمل العاثيات كناقلات للجين في الهندسة الوراثية وسيأتي الحديث عنها .



شكل (١٠-١) مسلك حياة الفاج

الفصل الحادي عشر

الهندسة الوراثية وتطبيقاتها

الهندسة الوراثية
GENETIC INGENEERING

مقدمة :

يعبر مفهوم الهندسة الوراثية عن جملة من التقنيات الحديثة التي نشأت من خلال التقدم الواسع في علم الخلية وعلم الوراثة الميكروبية والبيوكيمياء وعلم الاحياء الجزيئي .

تهدف الهندسة الوراثية او التلاعب بالجينات **Gene Manipulation** الى هندسة الجينات بطريقة محكمة ومسيطر عليها. فنسخة الجين يمكن اكثارها والصفات الوراثية يتم تتبعها بدراسة سلوك الجين المنقول او المعاد اتحاده وكذلك نواتج الجين لاستخدامه في العلاج .

فهرمون الانسولين على سبيل المثال تنتجه خلايا البنكرياس بكميات ضئيلة ويساعد في ايض السكر الا ان الهندسة الوراثية ساعدت على انتاجه من خلال نقل الجين المسؤول من خليته الى البكتيريا ذات القدرة العالية على الانشطار والتكاثر ليتكاثر معها وبالتالي زيادة انتاج كمية الهورمون .

لقد استهدفت تطبيقات الهندسة الوراثية جميع البروتينات ضئيلة الكمية في انتاجها في جسم الانسان لانتاجها بكميات كبيرة لاستخدامها في طرق طبية مختلفة لحل الكثير من المعضلات الحياتية والطبية لغرض تحسين صحة الانسان وزيادة انتاج الغذاء وتحسينه .

تتطلب الهندسة الوراثية عمليات الاضافة **Addition** او النقصان **Deletion** او اصلاح **Repair** قطع من المادة الوراثية ونتيجة لذلك تتغير الصفات المظهرية **Phenotype** للكائن الحي .

إن تغيير الصفات المظهرية يمكن عملها باستخدام طرق عديدة مختلفة بالاستبدال او الاحلال **Replace** او باصلاح المادة الوراثية .

ان تحسين التقنيات في التحليل الكيميائي لعديد النكليوتيدات تنقية الجينات، وقطع الدنا واعادة اتحاد الدنا **Recombinant-DNA** واندساس **Insertion** والنقل والتضاعف والادخال **Integration** والتعبير **Expression** لمادة الدنا الغير متماثلة تستخدم بشكل واسع في مجال الهندسة الوراثية لكائنات حية مختلفة .

ان اول خطوة في عملية نقل الجين هو التماثل او التطابق للجين او قطعة الدنا التي يجري نقلها .

يمكن نقل الجين بسهولة ويسر اذا توفرت منه عدة نسخ نقية او نقية نسبياً وذلك باستخدام تقنيات مختلفة للوصول الى هذه الغاية .

والجينات المنقاة يمكن ان تستخدم لتحويل خلية ما الى خلية مرغوبة بمساعدة لاقمات البكتيريا **Bacteriophages** او البلازميدات **Plasmids** وعندئذ يمكن التحكم والتلاعب بتعبيرها والسيطرة عليها .

التقنيات TECHNOLOGY

اولاً: التصنيع الكيميائي العضوي لعديد النكليوتيدات
Organochemical Synthesis of Polynucleotides

لقد استخدمت هذه التقنية بعد المعرفة التامة بالتركيب الكيميائي الجزيئي للاحماض النووية . وهذه التقنية تزود الباحثين بطريقة سهلة للتلاعب والتحوير

لتكرار النكـليوتيدات . تحتاج هذه التقـنية الى قطع صغيرة جداً مـن الحامض النووي مع تكرار قواعد معينة لازمة للبناء وقد تمكـن عدد من الباحثين من تخليق قطعة الدنا وامـكن اسـتخـدامـها فـي تـكويـن شفـرة لاربـعة عـشر حـامـض أميـنـي للـهرمـون Somatostatin الذي ينـظم نمو الجسـم وكذلك في انـتاج هورمون الانـسولين والكلوكاكون المنظمان لمستوى السكر في الدم .

وللوصول الى هذه النتائج تم تخليق قطع صغيرة حوالي خمسة عشر قطعة من النكليوتـيدات معروفة في تسلسل قـواعدها النتروجينية عـلى النهاية (O - OH-) وبمساعدة مركب الـطاقة ATP والانزيم Polynucleotide Kinase ومن هذه القـطع الصغـيرة المتجـاورة تم تصنيـع معقد حـلزوني مزدوج فـي محلول مـائي وبالتالي تم ربط هذه القطع مع بعضها البعض بمساعدة انزيم الربط Ligase .

1	4	6	9	10	12	14
2	3	5	8	13	15	

القطع الصغيرة عدد (١٥) مزدوجة في المحلول والتي تربط بالانزيم Ligase

ثانياً : تقنيات نقل الكروموسومات

اندماج البروتوبلاست : Protoplast Fusion

لقـد استخـدم اندمـاج البرتـوبلاست لاول مـرة مع الخلايـا النبـاتـيـة والحيواتـية لـلحـصول عـلى هـجـين Hybrid ذو صفـات وراثـيـة جـديدة عـن طريـق نقـل الكـرومـوسـومـات وذلك بمسـاعدة عديـد الايثانـول الكلايـكول Polyethylene Glycol (PEG) الذي يعمل على زيادة معدل اتحاد واندماج البروتوبلاست .

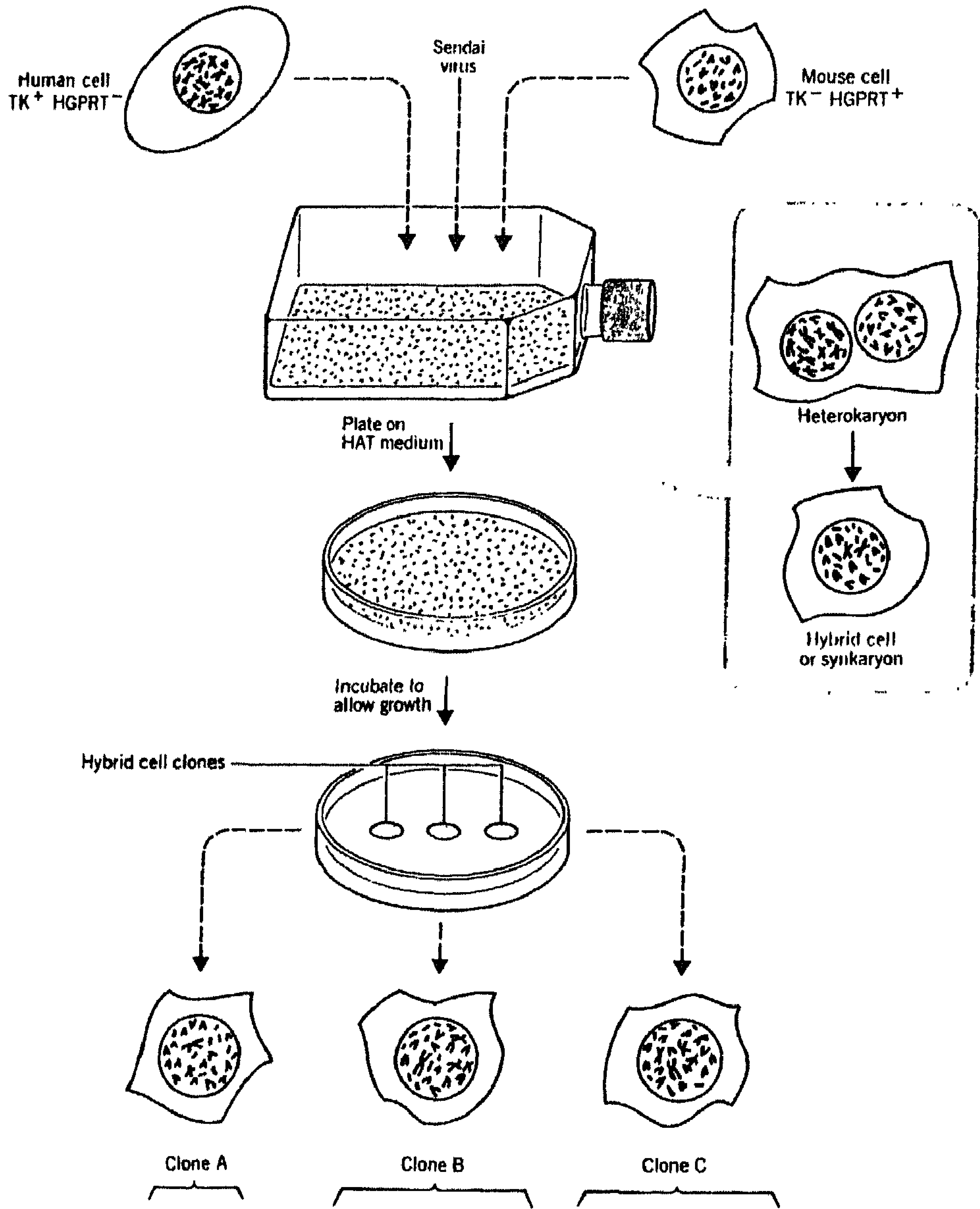
وعند تكوين الكالوس **Callus** تضاف الهورمونات النباتية اللازمة لعملية التمايز لتكوين المجموعة الجذرية والخضرية (الجبريلينات) ومن ثم ينقل الهجين الى التربة .

تستخدم هذه التقنية للحصول على هجين لا يمكن الحصول عليه بالتهجين الخلطي (لعدم التوافق) وللحصول على اصناف نباتية مقاومة للامراض النباتية والحشرات وحاملة لصفات مرغوب فيها .

كذلك استخدمت هذه التقنية مع الفطريات والبكتيريا والاكتينوميسيتات مثل انواع من الفطر البنسيليوم **Penicellium** وانواع من جنس **Aspergillus** ومع الخمائر مثل **Candida** وبها يمكن اعادة التشكيل الوراثي **Recombination** وبالتالي الى تحسين السلالات الصناعية .

وفي مجال الخلايا الحيوانية امكن دمج خلية الانسان جسمية مع خلية الجرذي لتكوين بروتوبلاست هجين ثنائي النواة الذي يتبعه اندماج النواتين بنواة واحدة وقد استخدم لهذا الغرض عديد الاثلين الكلايكول (**PEG**) او باستخدام الفايروس ساندي **Sandi Virus** المعاق اشعاعياً لزيادة معدل اتحاد البروتوبلاستات بعد تغيير اغشية الخلايا وذلك لان تكرار اندماج الخلايا ضئيل جداً بحيث لا يتعدى خلية واحدة لكل مليون خلية .

والهجين المتكون يستطيع العيش والانقسام ويحمل صفات الخليتين والشكل التالي (١١ - ١) يوضح عملية اندماج البروتوبلاستات لخلية الانسان الجسمية مع خلية الجرذي .



ثالثاً : تقنية الهيبريدوما : **Hybridoma Technology**

ويطلق عليها بتقنية الاجسام المضادة احادية النسلة **Monoclonal Antibodies** واساس هذه التقنية الاندماج الخلوي والحصول على هجين ذو تجمع وراثي جديد وقادت هذه الظاهرة الى تطور رئيسي في مجال علم المناعة .

من المعروف انه ليس بالامكان انتاج اجسام مضادة نقية في الحيوان الكامل لان هذه الحيوانات تتعرض بشكل متغير الى مستضدات **Antigens** مختلفة واغلبها تتضمن اختلافات انتيجينية محددة .

والنسلة الاحادية للاجسام المضادة تنتج بواسطة نمو الخلايا في المزرعة النسيجية في انبوبة الاختبار .

وهذه التقنية تم تطويرها من قبل ميلشتاين وكولر في منتصف السبعينات وقد مكنت هذه الدراسة الباحثين من دمج نوعين من الخلايا في خلية واحدة اطلق عليها اسم ال **Hybridoma** وهذه الخلايا الناتجة لها خصائص التعبير من كلاً الخليتين الاميتين .

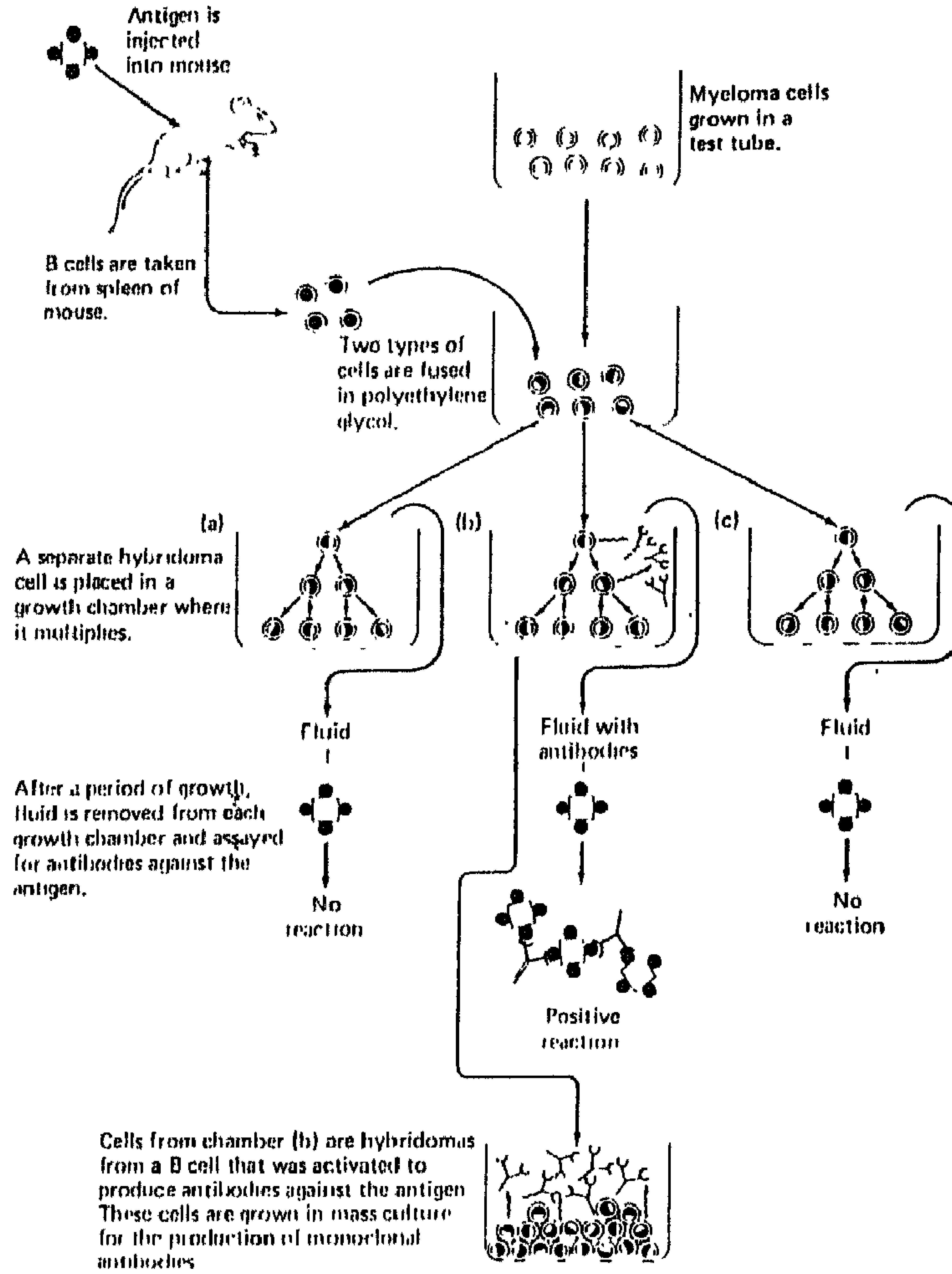
الخلية التي استعملت هي خلية سرطانية للجرذي **Myeloma cell** مع خلية مناعية بائية **B - cell** منشطة من طحال جرذي محصن (ملقح) .

ان للخلية السرطانية (المايلوما) القدرة غير المحدودة للنمو في انبوبة الاختبار لكن ليس لها القدرة على انتاج اجسام مضاده معينة اما الخلية البائية فلها القدرة على انتاج اجسام مضادة خاصة ضد مستضدات معينة ولكن لا يمكنها النمو في انبوبة الاختبار .

اما خلية الهيبريدوما الناتجة من اندماجهما فلها القدرة على النمو غير المحدود وانتاج اجسام مضادة خاصة في انبوبة الاختبار . ولم يسبق انتاج مثل هذه الاضداد النقية عندما كان الاعتماد على المخاليط غير النقية .

وغالباً ما يكون من الضروري حجز عدد من خلايا الهجين**Hybridoma** لايجاد واحدة لانتاج جسم مضاد نوعي مرغوب .

وفي الشكل التالي (١١-٢) يوضح تقنية الهيبريدوما .



وبسبب خصوصيتها للعمل على مستضد واحد فإن التفاعلات بين الاجسام المضادة احادية النسلة مع المستضدات اكثر دقة من تلك التي تنتجها الحيوانات الكاملة .

وتستعمل هذه التقنية في تشخيص الكائنات المجهرية والمستضدات وفي الطب والعلاج ضد الامراض المعدية والسموم ومكافحة بعض انواع السرطان .

ومن التطبيقات الاخرى ان لها القدرة على الالتصاق مع بعض العقاقير المحقونة في جسم المريض وتلتصق على الانسجة المريضة المستهدفة حيث يتركز تأثير العقار ضد الهدف مع اقل أثر على الانسجة الطبيعية .

كذلك تستخدم في الاغراض الصناعية لاقتلاع مواد من مزيج للكيمياويات وتشخيص بعض المكونات الناتجة بواسطة تفاعلات مناعية .

كما استخدمت هذه التقنية لاندماج خلايا تائية مع خلايا تائية لمفاوية سرطانية فالخلايات التائية الاولى المحفزة بمستضد تستطيع انتاج اللمفوكينات Lymphokines وهي بروتينات مناعية تفرزها الخلايا اللمفاوية التائية T-cell ومنها الانترفيرون وعامل نخر الورم Tumer Necrosis Factor حيث يتكون الهجين الذي تصبح له القدرة على انتاج وفير من هذه البروتينات .

وقد وجد ان هذه البروتينات فعالة في علاج اورام السرطان إذ تعمل على تضييق وسد الاوعية الدموية في الانسجة السرطانية فيمنع بذلك التغذية عن الورم ويرفع القدرة السمية للكريات البيض .

رابعاً : - عزل الجين **Gene Isolation**

لقد استخدمت بنجاح تقنية نقل الجين بواسطة الفاجات **Transducing Phages** وتهجين الـ **DNA - DNA** في عزل جينات البكتيريا .

ان اول جين تم عزله في البكتيريا المعوية هو **Iac Operon** ان الجينوم المنقول بواسطة الفاجات هو اصغر بكثير من جينوم البكتيريا المستلمة وهذه الفاجات لها القدرة لحمل قطع صغيرة ومحددة لجينوم المضيف **Host Genome** ونتيجة لذلك يتحقق تنقية على درجة عالية .

فالاشرطة المكملة لجينوم البكتيريوفاج لمدا (λ) امكن فصلهما بعضهما عن

بعض الى شريطين باستخدام تقنية الطرد المركزي المتدرج الكثافة المتساوي **Equilibrium Density Gradient Centrifugation** حيث ان احد الاشرطة يكون من النوع الثقيل **Heavy (H)** بينما يكون الاخر من النوع الخفيف **Light(L)** باستخدام محلول مشبع من كلوريد السيزيوم .

Poly GU (بوليمر مصنع) يرتبط مع احد الاشرطة وهذا ييسر عملية فصل الشريط الثقيل عن الشريط الخفيف وبشكل نقي .

وفي الشكل التالي يوضح استخدام طريقة عزل الجين وتنقيته للـ **Lac - Operon** للبكتيريا المعوية **E. Coli** .

سلالة B	سلالة A
خفيف A J i z y a	خفيف A J a y z i R
سلالة B	سلالة A
خفيف ´A ´J ´i ´z ´y ´a	خفيف ´A ´J ´a ´y ´z ´i ´R

فصل الشريطين ومزجهما

A J N R تمثل جينات البكتريوفاج بينما **a z y i** فتمثل جينات الـ **Lac - Operon** .

وتستخدم بعض الفاجات في النقل وخاصة بكتريوفاج لمدا (λ) هذه التقنية بسيطة وجيدة لكنها محدودة . اذ لا يمكن تطبيقها عند عدم توفر الفاج الخاص بالنقل .

كذلك يمكن استخدام تقنية تهجين **RNA - DNA** في عزل الجينات فلو امكن عزل جين الـ **m-DNA** بشكل كمي فيمكن استعماله كمصيدة **(trap)** للـ**DNA** المتمم على ورق الفلتر سلليلوزي او على الاعمدة **Column** وطريقة العمل سهلة جداً .

اذ أن **m-RNA** المنقى يمكن ربطه كيميائياً على الورق السلليوز فال**DNA** المحتوي للجين المعزول يمكن تنقيته بتغير من طبيعته **Denautred** ليعطي اشرطة مفردة والتي تتكسر الى قطع صغيرة وهذه القطع غالباً تحمل جين واحد . فعندما تمر هذه القطع من خلال ورق الترشيح السلليلوزي تحت شروط ملائمة للتهجين بين **DNA - RNA** فإن المتمم لل **(cDNA)** يصطاد ومن ثم تمر القطع الاخرى خلال ورق الترشيح . ويمكن عزل الهجين **RNA - DNA** والاشرطة المتممة تنفصل ويمكن للشريط المفرد من ال **DNA** ان يكون اشرطة مزدوجة بمساعدة جهاز من انزيمات البلمرة **Polymerase** مناسبة .

خامساً : تخليق الجينات انزيمياً

Enzymatic Synthesis of Genes

اذا امكن عزل **m - RNA** بشكل نقي فإن جينه المناظر يمكن ان يخلق بسهولة بمساعدة انزيمات مناسبة .

الانزيم الناسخ العاكس **(Reverse Transcriptase)** يمكن ان يستعمل لتشكيل الشريط المفرد المتمم

والـ m-RNA على قالب Complementary DNA(c DNA)
c DNA) يستخدم لتشكيل الـ DNA المزدوج الاشرطة، بمساعدة انزيمات التضاعف.

احدى الاكتشافات لاستخدام هذه التقنية تمت على تخليق قطعة ال (cDNA) المتمم لتخليق الانسولين في الجرذ على m - RNA الخاص بالانسولين المعزول من جزر لانكسرهانس من البنكرياس (Ullrich etal 1977) .

كذلك تمكن (Seeberg 1977) من تخليق المتمم (c DNA) على ال m-RNA الذي يشفر لتخليق هورمون النمو (RGH) الذي يحتوي على ١٩٠ حامض اميني بعد عزل وتنقية m-RNA من خلايا الغدة النخامية Pituitary cells .

كذلك تمكن (Shine etal 1977) من تخليق الهورمون Chorionic Somatomammtropiu (HCS) في الانسان بهذه الطريقة .

لقد استخدمت هذه التكنولوجيا بشكل واسع وذلك لانها تحتاج فقط لكمية صغيرة نقية من ال m - RNA .

سادساً : - اختيار الناقل

Selection of A Vector

يعزل الجين او قطعة من الـ DNA وتنقى تصبح جاهزة لنقلها Transferred الى الخلية المرغوبة Desired cells .

إن اختيار وعزل وتنقية الناقل (Vector (Carrier الملائم عملية ضرورية لنقل المادة الوراثية بنجاح .

ويمكن استخدام البكتريوفاجات او البلازميدات كناقلات للمادة الوراثية . حيث

تعتبر هذه الناقلات كالحافلات وجزيئات الـ **DNA** كمسافرين وتعمل على تضخيم الجين **Gene Amplification** فالناقل له القدرة علـى التضاعف داخل الخلية المضيفة وجزيئات ال **DNA** المحمولة يمكنها كذلك التضاعف معه .

فطالما الناقل هو المسؤول للتضـاعف او تشكيـل النسل **Cloning** الغـريبة **Foreign** في مضيفه فيعرف لذلك بناقل النسل **Cloning Vector** .

هناك عدد من الاعـتبارات الهامة لانجاح استعمـال نقل النسل في الهنـدسة الوراثية **Gene Ingeneering** وكما يلي : -

١- يجـب ان يحتوي نـاقل النسـلة على مـواقع للانزيمـات القاطعـة المحددة **Restriction Endonuclease** التي تـفتح الجينوم الـدائري كلما وعـندما تكون الحاجة لذلك .

٢- في حـال المزيـج من قطـع الـ **DNA** المحمـولة (المسافريـن)والنـاقلات المفتـوحة فيمكـن توليد ثلاثـة نماذج مختلـفة من جزيئـات الـ **DNA** المنقول الـنقي جزئية **DNA** الـناقل نقية وجزئيـة مشكلة من اتحاد **DNA** المـنقول والـ **DNA** الناقل .

فالشخـص يتمكن من جذب هـذه الناقلات واندساسهـا **Insert** في قطع ال **DNA** الغريبة مع مـزيج مغاير **Heterogenous** .

٣- حجم النـاقل يجب ان يكون بعد الاتحـاد مع الـ **DNA** المغاير لنقـلها الى المضيف .

٤- الخلايـا الحاملـة لناقـل النسـلة المحور **Modified C . V** يـجب ان يكون مماثل بيسر وحقيقة **With Certainty and Ease** .

٥- ناقلات النسلة ينبغي ان تخضع للحدود البايولوجية الصارمة لكي لا تهرب الى قطع غير مرغوبة من الـ **DNA** .

لقد استـخدم لهذا الغرض البكـتريوفاج (λ) والفايروسات المقـاربة له بشكل واسع لـقبـول ونقل النـسـلات وقطع ال DNA جينـوم ( ) مضـاعف ومسـتقيم **Linear** وزنه الجزيئي (٣١ × ١٠) ويكون معدي عندما يرتبط جينومه مع العلبة **Capsid** او الغطاء **Coat** .

البـلازميدات **Plasmids** وهـي قطع صـغيرة خـارج الكرومـوسومات الـتي تتضاعف ذاتياً توجد غالباً في اكثر اجناس البكتيريا .

النـقل الـوراثي خـلال عمـلية الاقـتران . يـعتـمد علـى جيـنات الـبلازمـيد . والبلازميدات تحمل جينات مقاومة للمضادات الحياتية والعناصر المعدنية الثقيلة لانتاج التوكسينـات (السموم) والسموم البكتيريـة **Bacteriocins** والقدرات الايضية غير الاعتيادية مثـل تحلل المركبات العضوية المعقدة والبلازميـدات غير لازمة للنمو او استمرار الحياة للخلية لأن ذلك يتم عن طريق جينات الكروموسوم الرئيسي .

إن اول بلازمـيد استـخدم للنـسلة الجـزيئيـة **Molecular Cloning** هو (**PSC 101**) بلازمـيد ستانـلي وكوهين (**PSC**) ١٠١ رقـم السلالة . كـذلك استـخدم البلازمـيد **COL E1** كناقـل بشكل كـبير وهو بـلازميد يشـفر لتكـوين بروتـين بكـتيـري **Colicin E 1** الذي يـقتـل البكـتيـريا الاخـرى الخالـية مـنه . وتستخـدم في الوقت الحاضر الـعديد من مشتقـات هذا البلازميد . ويمـكن ان توجد بلازميدات **PSC 101** و **Coli E1** منفصلة في نفس الخلية .

والبلازميدات الناقلة اضغر بكثير من كروموسوم λ والبكتيريا حيث يبلغ (١٥ - ١ زوج كـيلـو قاعـدة) بـينـما الـكـروموسـوم (من ٣٠٠٠ - ٥٠) الـى٥٠٠٠ وتتضاعف البلازميدات بشكل سريع جداً بالمـقارنة مع تضاعف الكروموسوم الرئيسي حيث انه يعطي تحت ظروف مثلى آلف الى ثلاثة الاف نسخة في الخلية .

كذلك يمكن استخدام بلازميد خلايا الخمائر في نقل النسلات وفي الخلايا حقيقية النواة يستخدم DNA البلاستيدات الخضراء والميثوكوندريا والفايروس (S V 40 (Simian كناقلات .

كما ان بلازميد Agrobacterium الذي يسبب ورم في النباتات المصابة في النقل للخلايا حقيقية النواة .

حيث يحمل الجين مع دنا الفايروس ليصيب الخلية المراد نقل الجين اليها فيندمج الجين المنقول مع دنا الخلية ويعمل فيها ويعبر عن نفسه بالاستنساخ والترجمة الى بروتين فعال كما يمكن نقل بلازميدات .

سابعاً : - Recombinant - DNA

اعاد التشكيل الوراثي للـ DNA
او اعادة اتحاد الـ DNA

ويطلق على هذه التقني بالتوصيل (ربط) الجينات Gene Splicing. والمصطلح Recombinant - DNA يعود الى ان جزيئات الـ DNA التي تخلق من ربط قطع من ال DNA من كائن حي في قطع للـ DNA للكائن حي اخر . غالباً ما يكون كائن حي (نبات او حيوان او بكتيريا او فايروس) يستخدم كواهب للـ DNA وتستخدم في الوقت الراهن عادة البكتيريا المعوي

E. coli كمستقبل للـ **DNA** بشكل رئيسي . وتستعمل البكتيريا المعوية في هذه الدراسة بشكل خاص لان تطابقها الوراثي درس بشكل تفصيلي ومعروف حالياً الكثير عن وراثة وكيمياء الحياتية للبكتيريا المعوية اكثر من اي كائن حي اخر . ان جينات البكتيريا المعوية والتي تبلغ (٤٠٠٠ -٣٠٠٠) تكون موجودة على كروموسوم واحد كبير حلقي الشكل . بالاضافة الى ذلك فإنها تحتوي على قطع صغيرة خارج الكروموسوم الرئيسي من الـ **DNA** تعرف بالبلازميدات والتي تتضمن على عدد قليل من الجينات . وتستخدم هذه البلازميدات في نقل قطع ال **DNA** لغرض تقنية الربط (الوصل) **Splicing Technique** ويطلق على بلازميدات البكتيريا مصطلح الناقلات **Vectors** وذلك لان المعلومات الوراثية لها تسمح بإيواء وتضاعف جزيئات الـ **DNA** المعادة الاتحاد **Recombinant Molecule** في خلية البكتيريا المعوية . كذلك يستعمل **DNA** الحلقي للفاج ليمدا (**phage λ**) كناقل لاصابة الـ **E.coli** ولكن هذه التجارب هي اقل شيوعاً واكثر خطورة من الناقلات السابقة اعلاه .

فعند توصيل قطعة **DNA** غريبة تحتوي على معلومات لصفات مرغوب فيها الى ناقل لـ **DNA** بمساعدة لانزيمات القاطعة (المقيدة) **Restriction Endonuclease** والانزيمات الرابطة **Ligase Enzymes** فإنه يحدث تقنية اعادة تشكيل الـ **DNA** التي يمكن نقلها مباشرة الى مضيف **Host** مناسب لغرض تضاعفها وتكوين نسلات **Cloning** منها وكما في الخطوات التالية (**Steps**) :

١- نقـل البكتـيريا المعـوية الى محـلول تنظـيف **Detergent** لغرض كـسر وفتح الخلايا .

٢- عزل الـبلازميـدات عن الـكروموسـوم الرئيـسي باسـتخـدام الطرد المـركزي التفاضلي .

٣- استخدام الانزيمات القاطعـة (**endonucleases**) لشطر البلازميدات الى قطع صغيرة معينة لخلق نهايات لزجة **Sticky Ends** .

٤- باستـخدام نفس انزيم الـقطع مع **DNA** الغريـب من كائن حي اخـر يتم انتاج قطع من الـ **DNA** لها نهاية متممة الى البلازميدات وبما ان الانزيمات القاطعة المختلف تحتوي على مواقع انشطار مختلف فيعطي شريط الـ **DNA** عدد من القطع مختـلفة الاطوال ومن ثم يـكون من الممكـن ادخال **Insert** أي جينات عريـبة في خلية **E.coli** .

٥- يعمل انـزيم الربط **DNA - Ligase** على ربط وسـط القطعة الغـريبة في مكان ما في البلازميد .

٦- ينقل البلازميد المعاد ربطه في محلـول كلوريد الكالسيوم الذي يحتوي على خــلايا **E.coli** . وعنــد تسـخين المحلــول فإن غــلاف الخليـة يـصــبح نــفاذ **Permeable** ويسمح بدخول البلازميد .

٧- تتكاثر خلايا **E.coli** بالانقسام بمعدل مرة كل ٣٠ - ٢٠ دقيقة . فالخلايا الجديدة الـناتجة تحتوي علـى صفات من جينـاتها الاصلية بـالاضافة الى الجينـات التي نقلت اليها من انواع مختلفة .

تساعد هذه التقنية الباحثين على رسم خرائط وتسلسل الجينات والكشف عن الوظائف المختلفة لجينات الكائنات الحية .

ان فهم وظيفة الجين وتنظيم الجين هي هدف اساسي للباحثين في علاج مرض السرطان .

كما يمكن علاج الكثير من الامراض الوراثية .

فإذا امكن دس (ادخال) الجينات الملائمة في خلايا **E.coli** لأنه يمكن انتاج كميات وفيرة من الانسولين (لامراض السكر) وعوامل التخثر في حالة الاصابة بنزف الدم الوراثي (الهيموفيليا) والانزيمات المفقودة والهورمونات والفيتامينات والاجسام المضادة الخ . . .

فجزيئات اعاد تشكيل الـ **DNA** التي تتضمن جينات تخليق وانتاج الانترفيرون **Interferon** (وهو بروتين سكري (**Glycoprotein**) الذي يعمل على قتل الفايروسات والمحفز لجهاز المناعة) والانسولين البشري وهورمونات النمو والانزيم **Urokinase** وهو انزيم بشري يستعمل سريرياً في ذوبان تخثر الدم) فإنها تمت بنجاح في خلايا البكتيريا المعوية .

كما انه بالامكان تربية البكتيريا المعوية البشرية التي تهضم السلليلوز لتكوين سلالات تعمل على تكسير المركبات وتنظيف بقع الزيت وكذلك تخليق نباتات جديدة تستطيع ان تحصل على النتروجين مباشرة من الهواء بدلاً من المخصبات .

وفي الاونة الاخيرة استطاع الباحثين في علم الاحياء الجزيئي النباتي من استخدام بلازميدات انواع من البكتيريا مثل بكتيريا **Agrobacterium tumefaciens** والتي تسبب اورام في العديد من النباتات .

وقد نجح العلماء لتقديم جينات للعديد من البروتينات الغريبة (من ضمنها

بروتينات حيوانية) في النباتات بواسطة هذه البكتيريا وفي نفس الوقت تعمل على ازالة قدرتها على حدوث الورم .

ومن التطبيقات العملية هو نقل جين ضروري لتخليق نقصان حامض اميني في نبات معين (مثل جين المثيونين في نبات الصويا) .

ولكن من ناحية اخرى ربما تسبب هذه الكائنات المهجنة اضرار كبيرة فسيولوجياً وبيئياً وصحياً بهذه التقنة لا يتنبأ بالعاقبة .

وقد تمكن احد الباحثين من تطوير سلالة من **E.coli** عام **(1976**) لا يمكنها النمو الا تحت ظروف المختبر (اذ تحتاج الى مغذيات تضاف للوسط لكي تعيش) والتي اصبحت قد الاستعمالات في الوقت الحاضر لتطبيقات تكنولوجيا اعادة التشكيل الوراثي **Recombinant.** .

وفي مجال انتاج اللقاحات **Vaccines** لبعض الامراض الخطرةمثل التهاب الكبد الفايروسي **Hepatitis B Virus** وفي محاربة مرض نقص المناعة المكتسب (الايدز) .

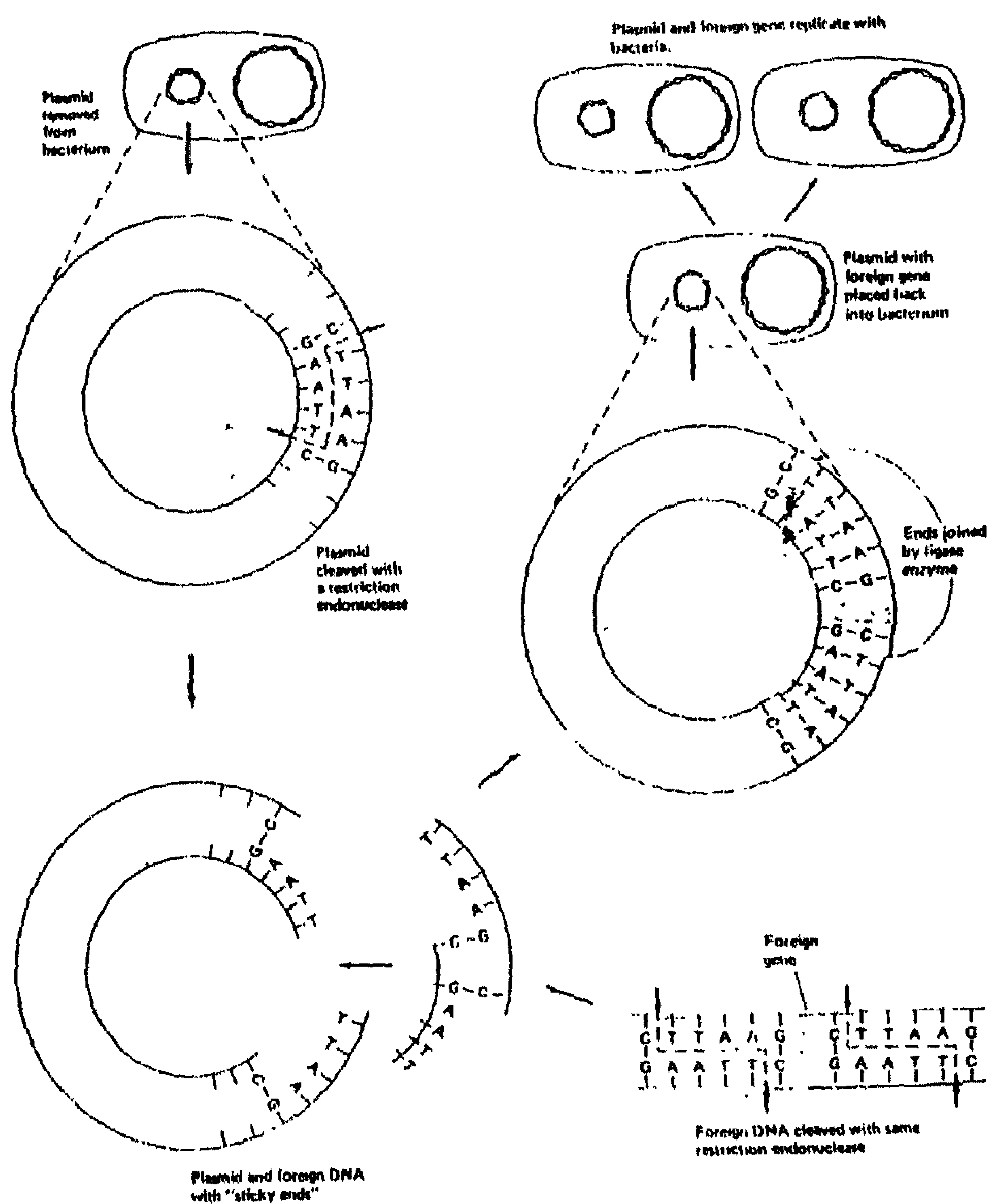
كذلك تستخدم هذه التقنية في انتاج بروتين احادي الخلية **Single Cell Protein** التي تستخدم كأعلاف للمواشي والدواجن والاسماك .

وفي مجال التلوث تم انتاج انزيمات محللة لكثير من المواد بدل استعمال المواد الكيميائية .

كما ان هناك دراسات حول استبدال الاسمدة الكيمياوية التركيبية بواسطة تثبيت النتروجين بين البكتيريا والنباتات غير البقولية .

وفي الحقل الصيدلاني لانتاج المضادات الحياتية ومواد علاجية ضد الديدان الطفيلية وغيرها .

شكل (١١ - ٤) يبين عملية نقل الجين الى البكتيريا بواسطة الهندسة الوراثية



المراجـــع

-Alberts , B. (1983) The Molecular of the cell.

- Arber , W . (1985) : Recombinant DNA technology. Swiss Biotech (3) .

- Becker , W .M (1990) The world of the cell Menlopark , Benjamin , Calf .

- Bernard , D . D. etal (1980)

- Microbiology , Immunlogy, Molecular genetics (3rd edit.) Harper and Row pub .

- Burns , G .W .(1980) : Scince of Genetics 4th edit.

- Campell , P .N . (1965) : Protein biosynthesis Prog . Biophys . Mol . Biol . 15 .

- Davidison , J .N .(1972) : The Biochemistry of the nucleic acids 7th (AP) NY .

- De Roberties , E .D . and De Roberties (1987) cell and Molecular Biology 8th philadlephia .

- Emery , A . E . H (1985) An Introdution to Rcombinant DNA Wiley , Chichester .

- Gardner , E .J and D . P . Snustad (1984) Principles of Genetics (17th) .

- Giese , A . (1979) cell physilogy (5th edition) W . B. Saunders .philadlephia .

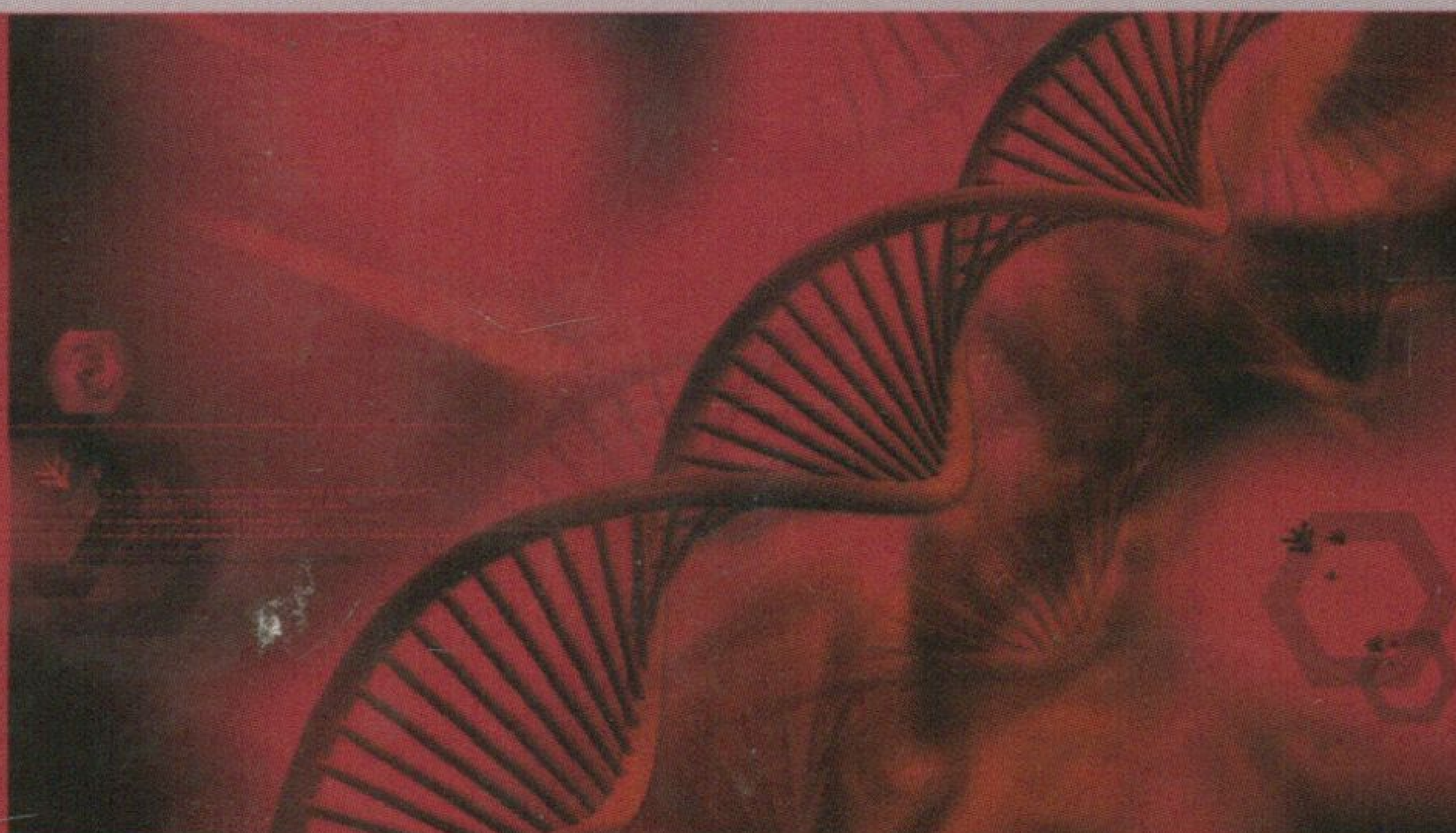
- Karp , G .(1984) : cell Biology (2nd edition) Mc Graw Hill book .

- Luria , S .E .et al (1978) General Virology (3rd edition) J .W .

- Nanniga , N .(1985) : Molecular Cytology of . E . coli . (AP) .
- Sheeler , P .and Bianchi , D .E .1987 cell and Molecular Biology . Structure , Biochemistry , Function . J . W .
- Stent , G .S . 1971 : Molecular genetics Freeman San Fransico.
- Wang .J . C. 1985 : Topoisomerases Ann . Rew . Biochemistry 54 .
- Watson , J .D . etal (1992) Recombinant DNA (2nd edition) Sci . Amer . Book N Y.

مقدمة في

علم الأحياء الجزيئي









دار صفاء للطباعة والنشر والتوزيع

المملكة الأردنية الهاشمية - عمّان - شارع الملك حسين

مجمع الفحيص التجاري - هاتف: 4611169 6 962+

تلفاكس: 4612190 6 962+ ص.ب 922762 عمّان 11192 الأردن

Safa@darsafa.info Safa@darsafa1.net Safa@darsafa.net

 دار صفاء للنشر والتوزيع

 دار صفاء للنشر